

Escola Superior de Saúde Egas Moniz



**A via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada
embrionária de ratinho**

Dissertação para obtenção do grau Mestre em Biologia Molecular em
Saúde

Marta Sofia Serra Batista

Mestrado Biologia Molecular em Saúde

Dezembro 2014

Escola Superior de Saúde Egas Moniz



**A via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada
embrionária de ratinho**

Dissertação para obtenção do grau Mestre em Biologia Molecular em
Saúde

Marta Sofia Serra Batista

Dissertação orientada por Doutor Alexandre Trindade e Doutora Maria
Elisabete Silva da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de
Lisboa

Mestrado Biologia Molecular em Saúde

Dezembro 2014

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

Clarice Lispector

Esta tese é dedicada aos meus pais.

Agradecimentos

Ao longo da realização deste trabalho foram muitas as pessoas que me ajudaram, contribuindo com o seu conhecimento científico, sabedoria, apoio e amizade, e às quais não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos.

Quero começar por agradecer ao meu orientador, Doutor Alexandre Trindade, por ter aceite o desafio de me orientar nesta etapa da minha vida, e de contribuir com todo o seu conhecimento científico, sabedoria e espírito crítico.

À minha co-orientadora Doutora Maria Elisabete Silva por todo o apoio, orientação e amizade durante este percurso.

Ao Professor Doutor Luís Lopes da Costa por ter aceite que os meus trabalhos de mestrado fossem desenvolvidos no Departamento de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), e pelo trabalho de orientação durante este período.

Ao Doutor Daniel Murta, quero agradecer por me ter acompanhado de perto desde o meu primeiro dia como bolseira na FMV-UL. Agradeço todo o apoio e companheirismo que sempre me disponibilizou, e o grande contributo para a minha evolução durante o percurso enquanto bolseira de investigação. Para além de todo o apoio, foi sem dúvida um grande, e divertido, companheiro de bancada.

A todas as minhas colegas e amigas do Departamento de Reprodução e Obstetrícia da FMV-UL, Sofia Henriques, Mariana Batista, Patrícia Diniz, Ana Torres e Cristina Valado, cujo apoio e amizade foram fundamentais nos momentos mais críticos deste percurso.

A todas as pessoas da FMV-UL que de alguma forma me ajudaram e apoiaram e, assim, contribuíram para a realização deste trabalho.

À FMV-UL, ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal (CIISA) e ao projeto PTDC/CTV/105022/2008 da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), todo o apoio financeiro e logístico que permitiram a realização deste trabalho.

Aos meus colegas da 5ª edição do Mestrado de Biologia Molecular em Saúde com quem partilhei as dificuldades e as conquistas de todo este percurso. Em especial à

Mestre Vanessa Silva por ter sido um apoio essencial durante a componente curricular do mestrado. Não posso deixar de agradecer, também, à minha colega e amiga Andreia Ferreira que me acompanhou de perto durante a parte prática deste trabalho. Durante este período fomos partilhando as dificuldades e conquistas do dia-a-dia no laboratório, e ultrapassando todos os obstáculos com um sorriso no rosto.

Aos meus amigos e familiares que mesmo não compreendendo grande parte do que faço diariamente, sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Em especial ao meu pai e à minha mãe, quero agradecer a amizade, o carinho, o apoio incondicional e a motivação que sempre me transmitiram.

Resumo

A via de sinalização Notch é um mecanismo molecular conservado em termos evolutivos que regula o destino celular em vários sistemas, tanto na embriogénese como na idade adulta. No sistema reprodutor adulto masculino e feminino, o envolvimento desta via encontra-se descrito em diversos processos mas a informação acerca desta via na gónada embrionária é escassa. Assim, este trabalho pretende aprofundar o conhecimento acerca do envolvimento desta via na gónada embrionária, tendo como objetivos analisar o padrão de expressão dos membros da via durante o desenvolvimento da gónada e avaliar a função do ligando Dll4 durante este processo.

Para realizar a caracterização do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada foram utilizados murganhos da estirpe *CD1*. Para determinar a função *in vivo* do ligando Dll4 foi utilizada a linha de murganhos transgénicos Dll4 lox/lox CAG-Cre, sendo analisados os seguintes estádios de desenvolvimento: indução das fêmeas gestantes aos 9.75dpc e recolha dos embriões aos 11.5dpc; e indução das fêmeas aos 11.5dpc e recolha dos embriões aos 13.5dpc.

Observou-se a expressão de membros e efetores da via na gónada embrionária de macho e de fêmea ao longo do seu desenvolvimento. Na gónada embrionária de macho observou-se expressão de vários membros da via nas células germinativas, salientando-se o facto de a expressão de Dll4 se tornar específica das células de Leydig a partir dos 12.5dpc. Este resultado sugere que a via poderá desempenhar um papel na regulação da população de células de Leydig fetais. Na gónada embrionária de fêmea observou-se durante o seu desenvolvimento a presença de membros e efetores da via nas células germinativas, facto que não tinha sido anteriormente descrito.

Não foi possível obter resultados conclusivos acerca da função do ligando Dll4 no desenvolvimento da gónada, contudo, este trabalho permitiu adquirir novos conhecimentos acerca da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho.

Palavras-chave: Notch, Gónada, Embriologia, Dll4

Abstract

The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved molecular mechanism capable of regulating cell fate in various organs both in embryogenesis and in the adult. In the adult male and female reproductive system, the involvement of this pathway is described in several processes but information about this pathway in the embryonic gonad is scarce. This work aims to analyze the expression pattern of members of the Notch signaling pathway during the development of the mouse gonad and evaluate the function of the ligand Dll4 during this process.

To characterize the expression pattern of the Notch pathway members in the development of gonads CD1 mice were used. To determine the in-vivo function of Dll4 ligand of Notch pathway the mutant mice Dll4 lox / lox CAG-Cre were used. The following developmental stages were analyzed: induction of pregnant females at 9.75dpc and collection of the embryos at 11.5dpc; and induction of pregnant females at 11.5dpc and collection of embryos at 13.5dpc.

We observed the expression of Notch pathway members and effectors of the pathway in the embryonic gonads of male and female throughout its development. In the developing male gonad, pathway members were detected in germ cells and, of special notice, Dll4 expression becomes specific of Leydig cells from 12.5dpc on. This result suggests that the pathway may play a role in regulating the population of fetal Leydig cells. In the developing female gonad we observed the presence of members and effectors of the pathway in the germ cells, which had not been previously described at this stage of development.

It was not possible to obtain conclusive results about the function of the ligand Dll4 in developing gonads; however, this research provides new knowledge about the Notch pathway in the development of the embryonic mouse gonad.

Key-Words: Notch; Embryology; Gonad; Dll4

Índice Geral

1.	Introdução.....	14
2.	Revisão da Literatura	17
2.1.	A via de sinalização Notch.....	17
2.1.1.	Origem histórica da via de sinalização Notch.....	17
2.1.2.	Componentes da via Notch.....	17
2.1.3.	Mecanismo de sinalização da via Notch	18
2.1.4.	Genes alvo da via Notch.....	19
2.1.5.	Mecanismos de ação da via Notch	20
2.1.5.1.	Inibição lateral.....	21
2.1.5.2.	Indução lateral.....	21
2.1.5.3.	Destino celular	22
2.1.5.4.	Manutenção das células estaminais	22
2.2.	Desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho	22
2.2.1.	Células da linha germinativa primordial	22
2.2.2.	Desenvolvimento da gónada e determinação do sexo.....	24
2.2.2.1.	Diferenciação testicular	26
2.2.2.2.	Diferenciação ovárica.....	27
2.2.3.	Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da gónada e determinação do sexo.....	29
2.3.	A via de sinalização Notch no Sistema Reprodutor	29
3.	Objetivos	31
4.	Materiais e Métodos.....	32
4.1.	Utilização de murganhos em investigação	32
4.1.1.	Sistema binário de recombinação Cre/loxP	33
4.1.2.	Genotipagem dos murganhos transgênicos.....	34
4.2.	Recolha de embriões	34
4.2.1.	Sexagem e genotipagem dos embriões pela técnica de PCR.....	37
4.2.2.	Criosecções dos blocos de gelatina dos embriões.....	37
4.2.3.	Análise dos embriões pela técnica de Imunofluorescência	38
4.2.4.	Análise dos embriões por microscopia de fluorescência	39
5.	Resultados	40

5.1. Caracterização do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho.....	40
5.1.1. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 10.5dpc	40
5.1.2. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 11.5dpc	41
5.1.3. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 12.5dpc	43
5.1.4. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 13.5dpc	46
5.1.5. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 14.5dpc	48
5.1.6. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 15.5dpc	50
5.1.7. Co-localização do ligando Dll4 e 3β-HSD na gónada embrionária macho	52
5.2. Estudo <i>in vivo</i> da função do ligando Delta-Like 4 no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho	53
5.2.1. Otimização da dose de tamoxifeno para indução das fêmeas gestantes ..	53
5.2.2. Estudo <i>in vivo</i> da função do ligando Delta-Like 4	54
6. Discussão	62
7. Conclusão.....	68
8. Bibliografia	69
Anexos	74
Anexo I – Extração de ADN genómico a partir de biópsia da cauda de murganho	74
Anexo II – Protocolo de PCR para determinação da presença de Cre	75
Anexo III – Protocolo de preparação do tamoxifeno.....	76
Anexo IV – Extração de ADN genómico a partir de tecidos embrionários.....	77
Anexo V - Protocolo de PCR para sexagem dos embriões	78

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura dos recetores e ligandos da via de sinalização Notch.....	18
Figura 2- Mecanismo de sinalização Notch(Adaptado de Mumm & Kopan, 2000). 19	
Figura 3- Mecanismo de inibição lateral da via Notch.....	21
Figura 4- Mecanismo de indução lateral da via Notch	22
Figura 5- Migração das células da linha germinativa primordial.	24
Figura 6- – Desenvolvimento da gónada embrionária de murganho.....	25
Figura 7 – Desenvolvimento e diferenciação do sistema de ductos genitais.....	26
Figura 8 – Estrutura do testículo embrionário.	27
Figura 9 - Representação esquemática do desenvolvimento do ovário e diferenciação folicular.....	28
Figura 10 – Representação esquemática do funcionamento do sistema de recombinação Cre/loxP.	33
Figura 11 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do recetor Notch 1 e ligando Dll4 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 10.5dpc.	40
Figura 12 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch 3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag 2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 11.5dpc.....	42
Figura 13 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 11.5dpc... 43	
Figura 14 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch 3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag 2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 12.5dpc.....	45
Figura 15 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 12.5dpc... 46	
Figura 16 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch 3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag 2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 13.5dpc.....	47
Figura 17 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 13.5dpc... 48	

Figura 18 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch 3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag 2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 14.5dpc.....	49
Figura 19 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 14.5dpc... 50	
Figura 20 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch 3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag 2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 15.5dpc.....	51
Figura 21 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 15.5dpc... 52	
Figura 22 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 e do marcador 3 β -HSD nas gónadas embrionárias de macho de 13.5dpc, 14.5dpc e 15.5dpc.....	53
Figura 23 - Análise macroscópica dos embriões recolhidos.	55
Figura 24 – Coloração de hematoxilina-eosina nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos..	56
Figura 25 - Coloração de Hematoxilina-eosina nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos.	57
Figura 26 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos.	58
Figura 27 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos marcadores Sox9; 3 β -HSD e FOXL-2 nas gónadas embrionárias dos machos controlos e induzidos.....	59
Figura 28 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 nas gónadas embrionárias das fêmeas controlos e induzidos.....	59
Figura 29 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos marcadores Sox9; 3 β -HSD e FOXL-2 nas gónadas embrionárias das fêmeas controlo e induzidas.....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados.....	38
Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados.	39
Tabela 3 – Esquema síntese do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho..	65

Lista de Siglas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMH	Hormona anti-mulleriana
bHLH	Domínios básicos hélice-base-hélice
BLIMP	B lymphocyte-induced maturation protein 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
Dll1	Delta-like 1
Dll3	Delta-like 3
Dll4	Delta-like 4
Dpc	Dias pós-cópula
DSL	Delta, Serrate e LAG2
EGF -like	Domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico
FCT	Fundação para a Ciência e Tecnologia
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
HE	Hematoxilina-eosina
HERP	Hes-related repressor protein
Hes	Hairy/Enhancer of Split
Hey	Hairy related transcription factor
Jag 1	Jagged 1
Jag 2	Jagged 2
NECD	Domínio extracelular de Notch
NICD	Domínio intracelular de Notch
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Recção em cadeia da polimerase

PEST	Proline, Glutmate, Serine, Treonine
PGC	Células primordiais da linha germinativa
PM	Células mióides peritubulares
RAM	RBP-Jk-Associated Molecule
RNA	Ácido ribonucleico
Sry	Sex-determining region of chromossome Y
TAD	Transcription Transactivation Domain
TM	Domínio transmembranar

1. Introdução

A via de sinalização Notch é um mecanismo molecular conservado ao longo da evolução dos metazoários que está envolvida em múltiplas decisões de destino celular e na regulação de eventos fisiológicos e patológicos nos mamíferos, como a neurogênese, angiogênese embrionária e a neo-angiogênese pós-natal, entre outros (Borggreffe & Oswald, 2009). Esta via de sinalização é composta por quatro recetores (Notch 1,2,3,4) e cinco ligandos (Delta-like 1,3,4 e Jagged1,2), todos eles proteínas transmembranares. A interação de um ligando presente na superfície de uma célula com um recetor presente na superfície de uma célula vizinha conduz à ocorrência de uma série de eventos proteolíticos do recetor Notch nos espaços intercelular, perimembranar e intracelular. Estes eventos proteolíticos resultam na libertação do domínio intracelular de Notch (NICD - *Notch intracelular domain*), que é translocado para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição acessórios e induz a expressão de um conjunto de genes alvo (Borggreffe & Oswald, 2009; Thurston, Noguera-troise, & Yancopoulos, 2007).

O envolvimento de membros da via de sinalização Notch na função das gónadas masculina e feminina adultas já se encontra descrito (Johnson, Espinoza, McGaughey, Rawls, & Wilson-Rawls, 2001; Daniel Murta et al., 2013; Trombly, Woodruff, & Mayo, 2009; Vorontchikhina, Zimmermann, Shawber, Tang, & Kitajewski, 2005; Xu & Gridley, 2013; Zhang et al., 2011). No entanto, a informação acerca da expressão e função da via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada embrionária é escassa (Defalco, Saraswathula, Briot, Iruela-Arispe, & Capel, 2013a; Garcia, DeFalco, Capel, & Hofmann, 2013; Tang et al., 2008).

O sexo do embrião nos mamíferos é geneticamente determinado no momento da concepção por identidade cromossómica. Contudo, as gónadas formam-se como órgãos bipotenciais com a capacidade de se diferenciarem em testículos ou ovários, dependendo dos estímulos genéticos que recebem. Apenas num estágio mais avançado de desenvolvimento se evidenciam diferenças a nível morfológico (Eggers & Sinclair, 2012; Kim & Capel, 2006; Koopman, 2001; Ross & Capel, 2005; Wilhelm, Palmer, & Koopman, 2007).

As células primordiais da linha germinativa (PGC), que darão origem à gónada com capacidade bipotencial, surgem fora da região urogenital antes da formação da

gónada. As PGC têm origem na base da alantoide, na face posterior da linha primitiva, sendo detetadas por volta dos 7dpc (dias pós-cópula) na região posterior do intestino primitivo. Ao longo do desenvolvimento embrionário essa zona do intestino primitivo é invaginada, bem como as PGC e aos 9.5dpc estas células migram para a região urogenital, onde perdem a capacidade de mobilidade e começam a agregar e proliferar originando a gónada indiferenciada, que se apresenta como um espessamento do mesónefro (McLaren, 2003; Richardson & Lehmann, 2010).

A expressão do gene Sry (*sex-determining region of chromosome Y*) inicia-se por volta dos 10dpc e funciona como um interruptor genético para o desenvolvimento da gónada masculina. Após o início da expressão do gene Sry observam-se uma série de alterações morfológicas na gónada masculina. Na gónada feminina observam-se poucas alterações morfológicas durante este período de desenvolvimento, contudo, é possível fazer a distinção das gónadas femininas e masculinas com base na morfologia das mesmas (Ross & Capel, 2005).

Para além do gene Sry existem outros genes e vias de sinalização que estão envolvidos na determinação do sexo e diferenciação da gónada bipotencial, mas a informação acerca do envolvimento da via Notch nestes mecanismos é escassa. Assim, neste trabalho pretende-se aprofundar o conhecimento acerca do envolvimento da via de sinalização Notch na gónada embrionária, tendo como objetivos analisar a expressão dos membros da via e avaliar a função do ligando Dll4 durante o desenvolvimento embrionário da gónada, e assim, estimar o potencial da via Notch ser relevante no processo de desenvolvimento da gónada do embrião e na determinação do sexo.

Para realizar a caracterização do padrão de expressão dos membros da via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho foram utilizados murganhos da estirpe CD1. Deste modo, foram recolhidos embriões resultantes do cruzamento dos murganhos da estirpe CD1 nos seguintes estádios de desenvolvimento embrionário: 10.5dpc; 11.5dpc; 12.5dpc; 13.5dpc; 14.5dpc e 15.5dpc.

Para a avaliação da função *in vivo* do ligando Delta-like 4 durante o desenvolvimento da gónada embrionária foi utilizada a linha de murganhos transgénicos

Dll4^{lox/lox};CAG-Cre. Foram analisadas duas idades correspondentes a diferentes estádios de desenvolvimento embrionário: indução das fêmeas gestantes com 1,5mg de tamoxifeno aos 9.75dpc e recolha dos embriões aos 11.5dpc; e indução das fêmeas aos 11.5dpc e recolha dos embriões aos 13.5dpc.

As gónadas dos embriões recolhidos foram analisadas por imunofluorescência, tendo sido utilizados anticorpos para detetar membros da via Notch, que foram co-localizados com o anticorpo anti-PECAM.

2. Revisão da Literatura

2.1. A via de sinalização Notch

2.1.1. Origem histórica da via de sinalização Notch

A via de sinalização Notch é um mecanismo molecular altamente conservado ao longo da evolução dos metazoários que está envolvido em múltiplas decisões de destino celular e na regulação de eventos fisiológicos e patológicos nos mamíferos, como a neurogênese, angiogênese embrionária e a neo-angiogênese pós-natal, entre outros (Borggreve & Oswald, 2009). A designação desta via deve-se à descoberta de um gene em *Drosophila melanogaster* (vulgarmente conhecida como mosca da fruta), cuja perda de função parcial resultava no aparecimento de indentações (*notches*) nas margens das asas deste modelo animal (Mohr, 1919; Morgan, 1917). Em 1937, descobriu-se o fenótipo embrionário letal da mutação de perda-de-função deste gene em *Drosophila* (Poulson, 1937). Estas mutações produziam um fenótipo neurogênico, nas quais as células destinadas a constituir a epiderme mudavam de destino e originavam tecido neural (Artavanis-Tsakonas, Rand, & Lake, 1999; Fiúza & Arias, 2007). Embora tenha sido inicialmente descrito o fenótipo neurogênico, mais tarde descobriu-se que a sinalização Notch é na realidade pleiotrópica.

2.1.2. Componentes da via Notch

Nos mamíferos a via Notch é composta por cinco ligandos transmembranares – Delta-like 1 (Dll1), Dll3, Dll4, Jagged 1 (Jag1) e Jag2 – que partilham homologia estrutural. Os ligandos são proteínas transmembranares compostas por um domínio extracelular altamente conservado DSL (Delta, Serrate e LAG2), seguido de várias repetições do domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like) – seis repetições em Dll3, oito em Dll1 e Dll4 e dezoito em Jag1 e Jag2. O domínio DSL é a única unidade necessária para a interação com os recetores Notch, mas as repetições EGF-like também têm um papel importante, uma vez que estabilizam a interação recetor-ligando. Nos ligandos Jag1 e Jag2 existe um domínio rico em cisteína (CR), seguido de um domínio transmembranar e uma pequena porção citoplasmática (Figura 1) (Thurston et al., 2007).

Os quatro recetores Notch presentes nos mamíferos (Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4) são proteínas transmembranares que também partilham homologia

estrutural, sendo compostos por um domínio extracelular (NECD), um domínio transmembranar pequeno (TM) e um domínio intracelular (NICD). O domínio NECD é composto por um grande número de repetições *EGF-like* (29 repetições em Notch4 e 36 repetições em Notch1), que são essenciais para a interação entre recetores Notch e os ligandos. Após as repetições *EGF-like* existem três repetições LN (Lin-12/Notch) ricas em cisteína que se pensa que atuem no sentido de inibir a ativação de Notch antes da sua ligação ao ligando. O domínio NICD é composto por um domínio RAM (RBP-Jk-Associated Molecule), seguido de seis repetições Ankyrin, que permitem a interação com o fator de transcrição CSL. Este domínio é constituído também por dois sinais de localização nuclear (NLS), uma sequência OPA (rica em glutamina) e uma sequência PEST (Proline, Glutamate, Serine, Treonine). Nos recetores Notch1 e Notch2 existe, ainda, um domínio TAD (Transcription Transactivation Domain), que compreende o domínio desde o segundo sinal de localização até ao domínio OPA (Figura 1) (Thurston et al., 2007).

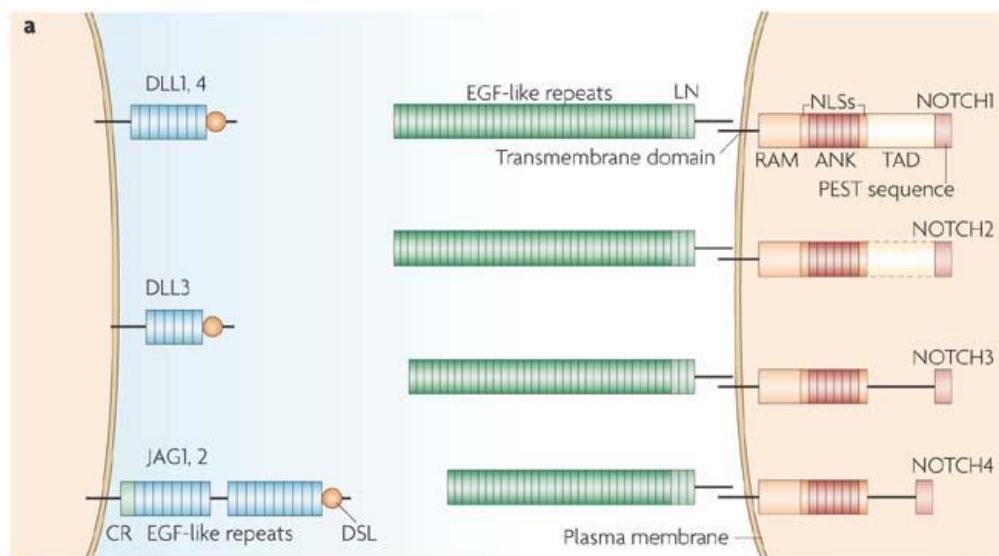


Figura 1- Estrutura dos recetores e ligandos da via de sinalização Notch (Adaptado de Thurston et al., 2007).

2.1.3. Mecanismo de sinalização da via Notch

O recetor Notch pode ser clivado proteoliticamente em 3 locais específicos. A primeira clivagem (S1) ocorre no aparelho de Golgi antes de a proteína chegar à membrana. Esta clivagem é catalisada pela enzima *furin-like convertase*, que cliva a recém-traduzida proteína Notch em duas porções, uma que engloba o domínio

NECD e outra que engloba o domínio TM e NICD. Estas duas porções ligam-se depois de forma não covalente formando um heterodímero que é inserido na membrana celular.

A via de sinalização Notch é ativada através da interação intercelular entre o recetor Notch e o ligando (Delta ou Jagged), esta interação desencadeia as outras duas clivagens proteolíticas (S2 e S3). A segunda clivagem (S2) ocorre no domínio NECD, após a ligação do ligando e permite a sua libertação da membrana celular. Esta clivagem é catalisada por uma metaloprotease da família ADAM. Após a clivagem S2, a clivagem S3, que é catalisada pelo complexo *gamma secretase*, é imediatamente desencadeada e é necessária para a libertação do domínio NICD. O domínio NICD é translocado até ao núcleo e atua como co-ativador transcricional. Como o NICD não se consegue ligar diretamente ao ácido desoxirribonucleico (ADN), este forma um heterodímero com a proteína RBP-Jk em mamíferos (também denominada CSL, CBF1, Su(H) e LAG-1 em espécies diferentes). Esta ligação a RBP-Jk remove co-repressores(R) e favorece a ligação de um conjunto de co-ativadores(A), formando um complexo transcricional que ativa a expressão de vários genes que estavam até então reprimidos (Figura 2) (Borggreffe & Oswald, 2009; Mumm & Kopan, 2000).

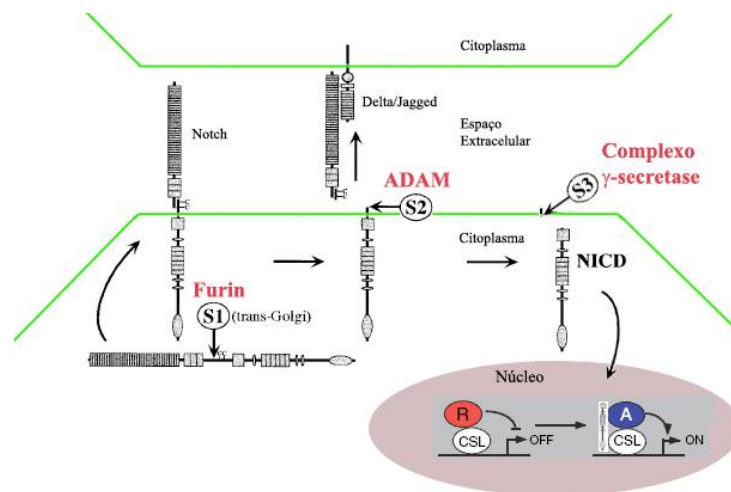


Figura 2- Mecanismo de sinalização Notch (Adaptado de Mumm & Kopan, 2000).

2.1.4. Genes alvo da via Notch

Embora a sinalização mediada pela via Notch possa estar envolvida em diferentes mecanismos, apenas um conjunto limitado de genes alvo desta via foram

identificados em diferentes contextos celulares e de desenvolvimento (Borggreffe & Oswald, 2009).

Após a entrada de Notch no núcleo e a sua ligação ao complexo transcricional formado por RBP-Jk, ocorre a ativação da expressão de genes da família Hes (homólogos de Hairy/Enhancer of Split) e Hey (também designados HRT- Hairy related transcription factor) ou *HERP* (*Hes-related repressor protein*) (Fischer & Gessler, 2007; Iso, Kedes, & Hamamori, 2003). Nos mamíferos são conhecidos 7 genes Hes e 3 Hey, e dependendo do tecido ou célula em que o recetor Notch é ativado variam os genes Hey ou Hes que são expressos (Iso et al., 2003). Todos estes genes codificam para fatores de transcrição com domínios básicos hélice-base-hélice (bHLH) que se ligam ao ADN com alta afinidade. Todos estes fatores, exceto o *Hes6* que antagoniza a atividade de Hes1, reprimem a transcrição de outros genes o que irá permitir a diferenciação entre células com e sem a sinalização Notch (Fischer & Gessler, 2007; Iso et al., 2003).

Estas proteínas Hes e Hey para além de formarem homodímeros podem também formar heterodímeros (Hes-Hey) constituindo repressores transcricionais ainda mais potentes que os homodímeros (Iso et al., 2003).

Embora ainda não se conheçam de forma precisa os mecanismos da regulação epigenética dos genes alvo da via Notch, é importante salientar que se pensa que as modificações nas histonas tenham um papel importante neste processo. A presença de modificações específicas pos-translacionais nas histonas determina transcricionalmente se os domínios de cromatina se encontram ativos ou inativos. A acetilação e a metilação representam as modificações mais comuns (Borggreffe & Oswald, 2009).

2.1.5. Mecanismos de ação da via Notch

A via de sinalização Notch permite que uma célula que expresse o ligando Delta ou Jagged altere o programa genético da célula vizinha que expressa o recetor Notch, podendo funcionar de modo indutório ou inibitório. No caso de a sinalização funcionar de modo inibitório a produção do ligando é reduzida (e a do recetor aumentada) na célula que recebe o estímulo Notch, sendo esta inibida de adotar o mesmo destino da célula vizinha. No caso de a sinalização funcionar de modo indutivo, a célula que recebe o estímulo Notch é induzida a produzir mais ligando (e

recetor), sendo induzida a adotar o mesmo destino celular da célula vizinha (Borggreffe & Oswald, 2009).

2.1.5.1. Inibição lateral

A inibição lateral é o mecanismo de ação da via Notch mais conhecido e o que parece ocorrer na maior parte dos contextos celulares. Neste mecanismo, dentro de um grupo de células do mesmo tipo que expressam quantidades iguais de ligando e de recetor (Figura 3, esquerda), apenas uma única célula começa a diferenciar-se. Por exemplo uma célula precursora neuronal, com o aumento da expressão na sua superfície de um ligando (Figura 3, direita). O ligando ativa a via de sinalização Notch nas células vizinhas, inibindo a diferenciação neuronal nas restantes células precursoras (Borggreffe & Oswald, 2009).

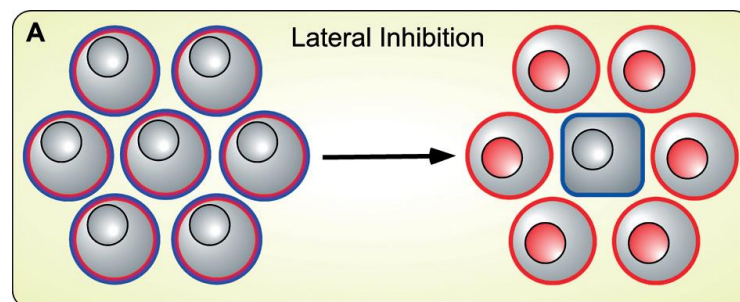


Figura 3- Mecanismo de inibição lateral da via Notch (Adaptado de Borggreffe & Oswald, 2009).

2.1.5.2. Indução lateral

Para além do mecanismo de inibição lateral descrito no ponto anterior, a sinalização Notch pode também induzir a produção dos ligandos Delta ou Jagged. Neste mecanismo, uma célula precursora (por exemplo, um precursor de células linfoides) é instruída a adotar um destino (por exemplo, células B) na ausência de um ligando Notch e a partir de um tipo de células (por exemplo, células do estroma) (Figura 4, linha superior). Na presença de ligando Notch, a via é ativada e a célula precursora é induzida a adotar um destino celular específico (por exemplo, célula T). (Figura 4, linha inferior) (Borggreffe & Oswald, 2009).

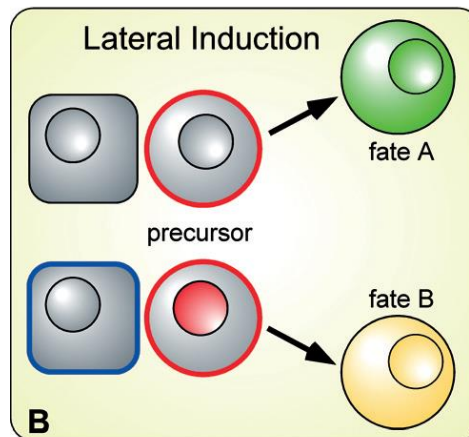


Figura 4- Mecanismo de indução lateral da via Notch (Adaptado de Borggreffe & Oswald, 2009).

2.1.5.3. Destino celular

A via de sinalização Notch tem um papel crucial como determinante do destino celular. Este mecanismo de ação ocorre quando a sinalização Notch entre duas células filhas é dependente da herança assimétrica de reguladores desta via e assim, estas vão assumir destinos celulares distintos (Borggreffe & Oswald, 2009).

2.1.5.4. Manutenção das células estaminais

A via de sinalização Notch tem ação na manutenção das células estaminais. Neste mecanismo, um tipo particular de células induz a sinalização Notch em células estaminais, de forma que estas se mantenham num estado indiferenciado. Um exemplo deste mecanismo de ação em vertebrados é a manutenção de células estaminais na cripta intestinal, um tecido altamente proliferativo. No intestino pós-natal a inativação específica de RBP-Jk resulta na perda completa de proliferação nas células de amplificação transitória (Borggreffe & Oswald, 2009).

2.2. Desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho

2.2.1. Células da linha germinativa primordial

As células da linha germinativa primordial (PGC) têm como função terminal transmitir, depois de recombinação meiótica, toda a informação genética de uma

geração à geração seguinte, sendo estas células essenciais para qualquer espécie que se multiplique através da reprodução sexuada (Geijsen, 2008; McLaren, 2003).

Devido à importância destas células para a sobrevivência das espécies, o seu processo de formação e migração é rigorosamente programado. A interrupção do processo de migração das PGC impede a fertilidade, e a sua migração para locais ectópicos pode originar tumores de células germinativas com uma localização extra-gonadal (Richardson & Lehmann, 2010).

Nos modelos de *D.melanogaster* e peixe zebra as PGC têm origem em germaplasma, um citoplasma especializado que contém ácido ribonucleico (RNA) materno e proteínas. Contudo, no ratinho as PGC não são especificadas pelo germaplasma. Este processo é induzido durante a gastrulação pela sinalização de BMP (Bone Morphogenetic Protein) e sinalização proveniente da ectoderme extra-embrionária e da endoderme visceral. Esta sinalização leva à indução da transcrição de BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) em células proximais posteriores do epiblasto, promovendo a expressão de genes específicos das PGC e reprime a expressão de genes das células somáticas (Richardson & Lehmann, 2010).

Após a especificação das PGC, estas adquirem motilidade e migram para o local onde vão originar a gónada. Este processo de migração é regulado pela combinação de sinais atrativos e repulsivos, que são específicos de cada passo deste processo (Richardson & Lehmann, 2010).

No ratinho durante a gastrulação as PGC são detetadas na base da alantoide, na face posterior da linha primitiva, e por volta dos 7dpc na região posterior do intestino primitivo. O passo inicial da migração das PGC consiste no movimento das células a partir da linha primitiva para a endoderme posterior aos 7.5dpc. Aos 8dpc as células migram ao longo da endoderme e aos 9.5dpc migram bilateralmente em direção à porção dorsal. Aos 10.5dpc alcançam a região genital para formar a gónada embrionária (Figura 5). No fim do processo de migração, as PGC perdem a sua capacidade de mobilidade e associam-se com células somáticas para formar a gónada embrionária, e começam a desempenhar funções de células germinativas, adquirindo morfologia específica do sexo (Richardson & Lehmann, 2010).

Atualmente, não existem evidências de diferenças específicas do sexo durante o processo de migração das PGC em nenhum organismo (Richardson & Lehmann, 2010).

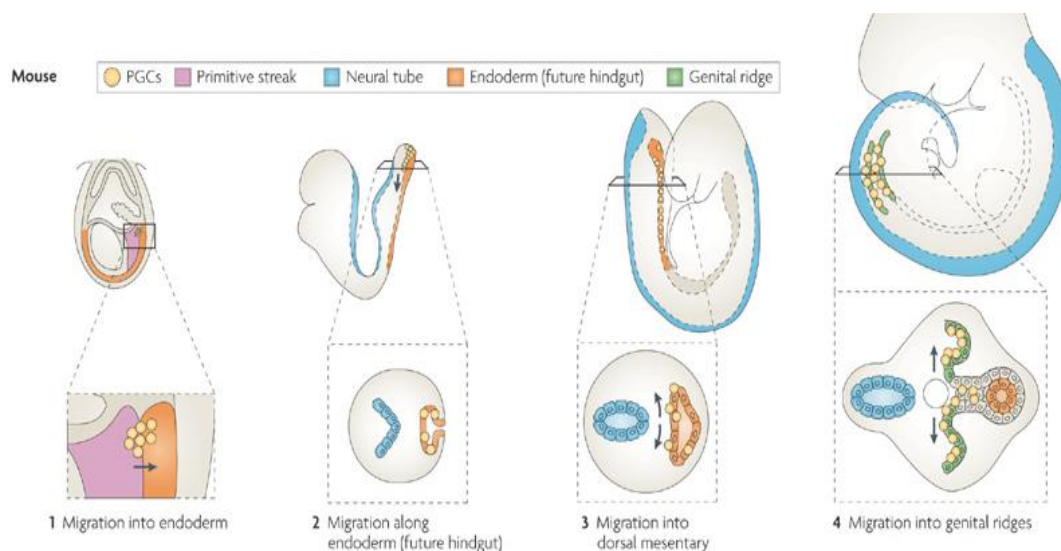


Figura 5- Migração das células da linha germinativa primordial (Adaptado de Richardson & Lehmann, 2010).

2.2.2. Desenvolvimento da gónada e determinação do sexo

Nos mamíferos, o sexo do embrião é determinado no momento da conceção por identidade cromossómica, mas as diferenças na gónada só se tornam evidentes num estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário, após um período de ambiguidade sexual em que a gónada embrionária tem capacidade bipotencial (Koopman, 2001; Wilhelm et al., 2007).

A gónada embrionária tem capacidade bipotencial, ou seja, pode dar origem a dois órgãos morfologicamente e funcionalmente distintos, os ovários e os testículos. O processo de determinação do sexo ocorre no embrião e determina o destino de desenvolvimento da gónada (Kim & Capel, 2006).

No murganho, a gónada surge por volta dos 10dpc como um espessamento do epitélio ao longo da superfície do mesonefro, e a proliferação destas células epiteliais dá origem às células somáticas da gónada. Como já foi referido, as células da linha germinativa primordial surgem fora da região urogenital e antes da formação da gónada, colonizando a região urogenital entre os 10.0 e 11.0dpc.

Entre os 10.5dpc e 12dpc inicia-se a expressão do gene Sry na gónada indiferenciada de embriões masculinos, o que desencadeia uma série de alterações morfológicas específicas da gónada masculina, como a diferenciação das células de sertoli, que circundam as células germinativas para formar os cordões testiculares, formação da vasculatura específica da gónada masculina, e diferenciação de células de Leydig.

Em contraste, na gónada feminina embrionária durante esta fase do desenvolvimento embrionário ocorrem poucas alterações morfológicas visíveis, salientando-se a entrada das células da linha germinativa na prófase da meiose entre os 13.5 e 14.5dpc (Figura 6) (Ross & Capel, 2005).

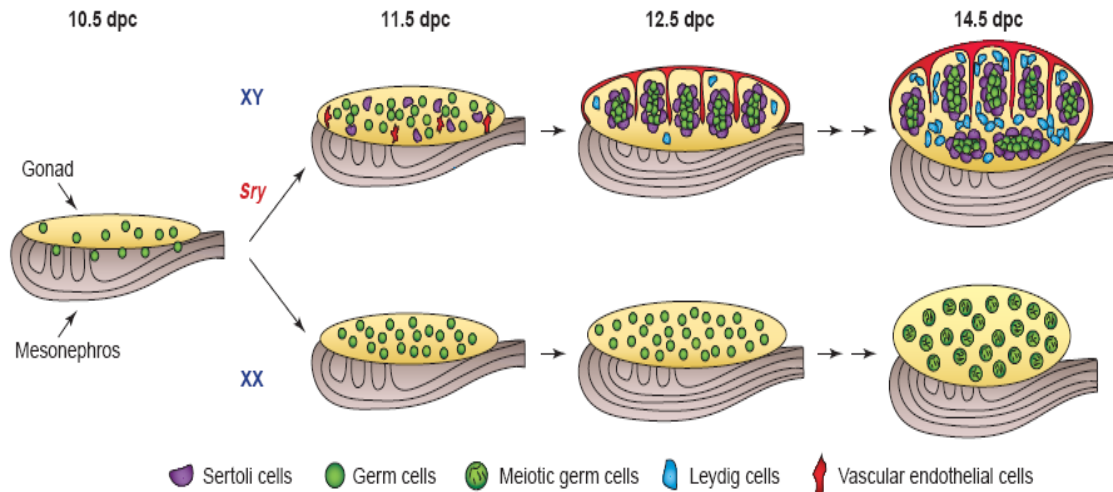


Figura 6- – Desenvolvimento da gónada embrionária de murganho (Adaptado de Ross & Capel, 2005).

Na fase em que a gónada mantém a bipotencialidade, estão presentes no mesonefro dois sistemas de ductos – os ductos paramesonéfricos (ou Mullerianos) e mesonéfricos (ou Wolffianos). Nos mamíferos, apenas um dos sistemas de ductos vai permanecer durante o desenvolvimento da gónada, dependendo da diferenciação da gónada em testículo ou ovário. Nos machos, os ductos Mullerianos degeneram sobre a influência da hormona anti-mulleriana (AMH) secretada pelas células de sertoli, enquanto os ductos Wolffianos permanecem e diferenciam-se em epidídimo, vaso deferente e vesículas seminais, sobre a influência das células de Leydig. Nas fêmeas, os ductos Wolffianos regredem e os ductos Mullerianos diferenciam-se em oviducto, útero e porção superior da vagina (Figura 7) (Wilhelm et al., 2007).

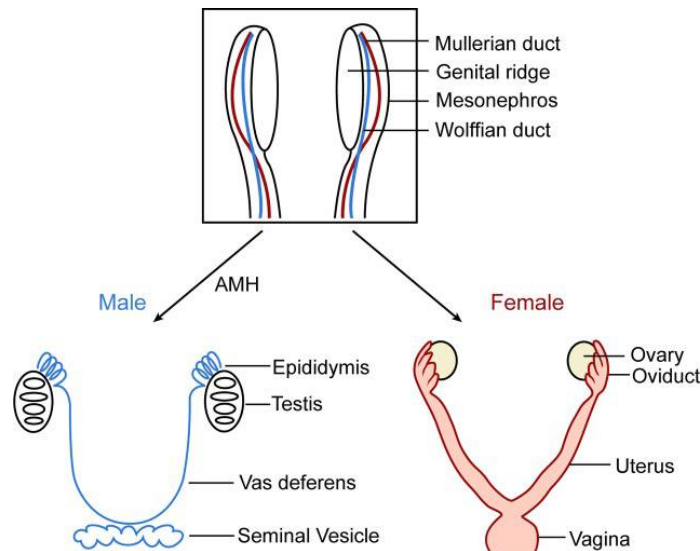


Figura 7 – Desenvolvimento e diferenciação do sistema de ductos genitais (Adaptado de Wilhelm et al., 2007).

2.2.2.1. Diferenciação testicular

O desenvolvimento da gónada masculina tem início com a expressão do gene Sry em células somáticas da gónada masculina entre 10.5 e 12dpc. O gene Sry funciona como interruptor genético para o desenvolvimento da gónada masculina. Vários autores demonstraram que a expressão deste gene é necessária para a formação dos testículos em embriões XY e induz a diferenciação de testículos em embriões XX (Ross & Capel, 2005).

Pouco tempo após o início da expressão de Sry existe um aumento acentuado da proliferação das células epiteliais da gónada masculina. Entre os 11.5 e 12.5dpc as células de sertoli diferenciam-se e circundam as células germinativas formando os cordões testiculares. Simultaneamente, células endoteliais migram do mesonefro da gónada masculina e organizam-se formando a vasculatura específica do testículo. As células de Leydig fetais diferenciam-se entre os 12.5 e 13.5dpc no espaço intersticial entre os cordões testiculares (Figura 8) (Ross & Capel, 2005; Wilhelm et al., 2007).

As células de sertoli são o primeiro tipo celular a diferenciar-se no testículo embrionário, sendo a sua diferenciação induzida pela expressão do gene Sry. Estas células têm um papel central na organização da gónada masculina e na diferenciação dos restantes tipos celulares (Wilhelm et al., 2007).

Um dos tipos celulares que migram a partir do mesonefro para a gónada masculina são as células mióides peritubulares (PM). Estas células formam uma única camada celular que circundam as células de sertoli e circunscrevem os cordões testiculares. Têm duas funções na gónada masculina: contribuem estruturalmente para a formação dos cordões testiculares, em conjunto com as células de sertoli, e promovem o movimento dos espermatozoides maduros através dos túbulos seminíferos do testículo adulto (Wilhelm et al., 2007).

O interstício do testículo é composto maioritariamente por células de Leydig, que segregam androgénios, essenciais para a espermatogénese, competência reprodutiva e manutenção das características sexuais masculinas secundárias. Existem dois tipos de células de Leydig, as fetais, responsáveis pela produção de androgénios para a masculinização fetal, e as adultas, que se diferenciam após o nascimento. Embora ambos os tipos celulares possuam a capacidade de produzir androgénios, vários estudos demonstram que diferem morfologicamente e possuem diferentes perfis genéticos. É de salientar que as células de Leydig adultas não se originam a partir das células de Leydig fetais, diferenciando-se a partir de precursores mesenquimais pluripotenciais (Manuscript, 2012; Wilhelm et al., 2007; Wu, Wan, & Lee, 2007; Yao & Barsoum, n.d.). O interstício testicular é também composto por células endoteliais, fibroblastos e células sanguíneas, que formam a vasculatura específica da gónada masculina (Figura 8) (Wilhelm et al., 2007).

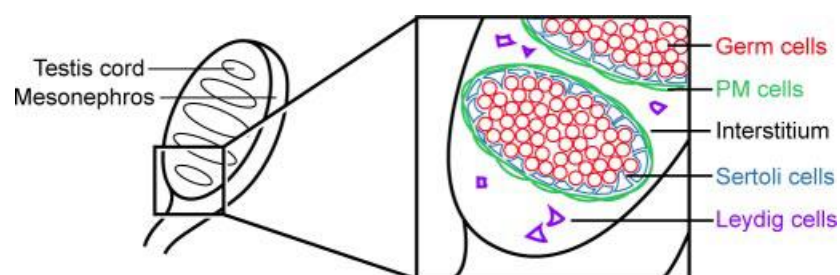


Figura 8 – Estrutura do testículo embrionário (Adaptado de Wilhelm et al., 2007).

2.2.2.2.Diferenciação ovárica

O ovário tem como função a produção de hormonas e o desenvolvimento de oócitos maduros, que uma vez fertilizados podem desenvolver-se em embriões. A unidade funcional do ovário são os folículos ováricos, nos quais os oócitos maduros estão

rodeados por células da granulosa e da teca. Ao contrário do testículo, no qual a unidade funcional – os cordões testiculares – se forma a nível embrionário por volta dos 12dpc, os folículos ováricos só se formam após o nascimento. A nível embrionário, a gónada feminina indiferenciada forma-se por volta dos 11.5dpc, onde se observam células da linha germinativa. Entre os 14.5dpc e 18dpc observam-se algumas alterações morfológicas na gónada feminina, como a organização das células germinativas em pequenos nichos ligados por pontes citoplasmáticas. Nesta fase existe um elevado grau de vascularização, composta por uma densa rede de pequenos vasos, que demarcam os nichos de células germinativas. Entre o primeiro e terceiro dia após o nascimento, ocorre uma rápida reorganização da morfologia do ovário, com a formação dos folículos primordiais (Figura 9) (Wilhelm et al., 2007). Durante a formação dos folículos primários, as células da pré-granulosa adquirem uma morfologia cuboide e começam a proliferar, o oócito aumenta em tamanho, e forma-se a zona pelúcida, e posteriormente o folículo fica rodeado por células da teca (Figura 9). Existem folículos primordiais que permanecem em estado quiescente, de forma que existe uma produção contínua de folículos pré-ovulatórios e de folículos de cada uma das fases (primordial, primário, secundário e antral). No entanto, nem todos os folículos ovulam com sucesso, muitos são perdidos durante a foliculogénese por um processo degenerativo que envolve a perda de células da granulosa por apoptose, e posteriormente perda do oócito (Wilhelm et al., 2007).

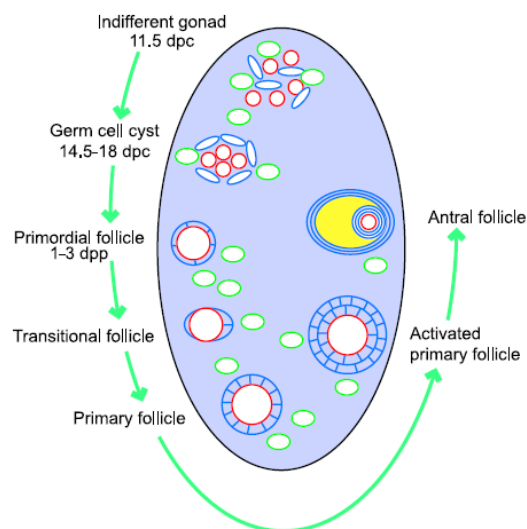


Figura 9 - Representação esquemática do desenvolvimento do ovário e diferenciação folicular. A vermelho estão representados os oócitos, a azul as células da granulosa, a verde as células da teca e amarelo o fluido antral. (Adaptado de Wilhelm et al., 2007).

2.2.3. Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da gónada e determinação do sexo

Como já foi referido por volta dos 10.5dpc inicia-se a expressão do gene Sry que desencadeia uma série de alterações que determinam a diferenciação do testículo, e consequentemente o desenvolvimento das características sexuais masculinas. Na ausência da expressão deste gene desenvolve-se a gónada feminina (Wilhelm et al., 2007). Apesar da importância do gene Sry para desencadear o desenvolvimento da gónada masculina, é de salientar que existem outros genes que desempenham um papel importante neste processo, como por exemplo Sox9, Sox8, Fgf9, Dmrt1 e Dax1 (Kim & Capel, 2006; Wilhelm et al., 2007).

A visão de que o desenvolvimento da gónada feminina é o destino por “defeito” do desenvolvimento da gónada primordial pode levar à assunção incorreta de que não existe a expressão de genes essenciais para que ocorra o desenvolvimento do ovário. Pelo contrário, vários estudos têm vindo a demonstrar que existe um robusto programa genético para o desenvolvimento da gónada feminina, salientando-se o papel dos genes Wnt4, Foxl2, Fst, RSPO1, Sf1 neste processo (Bernard & Harley, 2007; Boyer et al., 2010; Heikkilä, Peltoketo, & Vainio, 2001; Richards & Pangas, 2010; Vainio, Heikkilä, Kispert, Chin, & McMahon, 1999; Wilhelm et al., 2007).

2.3. A via de sinalização Notch no Sistema Reprodutor

A via de sinalização celular Notch é um mecanismo molecular conservado em termos evolutivos que regula o destino celular em vários sistemas, tanto na embriogénese como na idade adulta. No sistema reprodutor adulto vários autores tem descrito o papel desta via no processo de foliculogénese e de formação do corpo lúteo da gónada feminina (Johnson et al., 2001; D Murta et al., 2014; Trombly et al., 2009; Vorontchikhina et al., 2005; Xu & Gridley, 2013; Zhang et al., 2011). A via Notch está também envolvida no processo de espermatogénese da gónada masculina (Dirami, Ravindranath, Achi, & Dym, 2001; T. Hayashi et al., 2001; Mori, Kadokawa, Hoshinaga, & Marunouchi, 2003; Daniel Murta et al., 2013).

A nível da gónada embrionária, a via de sinalização Notch têm um papel importante na manutenção do balanço entre as células de Leydig adultas e as células de Leydig fetais (Defalco, Saraswathula, Briot, Iruela-Arispe, & Capel, 2013b; Tang et al.,

2008). Esta via desempenha igualmente um papel na regulação do destino das células que originam as espermatogónias, mantendo-as num estado indiferenciado, regulando o balanço entre a manutenção e diferenciação destas células nos testículos perinatais (Garcia et al., 2013; Garcia & Hofmann, 2013a).

3. Objetivos

Estabeleceram-se como objetivos deste trabalho:

- Avaliar a expressão dos membros da via de sinalização Notch na gónada durante a embriogénese do ratinho;
- Avaliar a função *in vivo* do ligando Delta-like 4 durante o desenvolvimento embrionário da gónada;
- Estimar o potencial da via de sinalização Notch ser relevante no desenvolvimento da gónada do embrião e na determinação do sexo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Utilização de murganhos em investigação

O murganho (*Mus musculus*) é o modelo animal mais utilizado em investigação biomédica. O primeiro resultado da sequenciação do seu genoma (Mouse Genome Consortium, 2002) surgiu pouco tempo depois da sequenciação do genoma humano (Human Genome Consortium, 2001), revelando-se o conhecimento da sequência do genoma do murganho fundamental para a compreensão do conteúdo do genoma humano e uma importante ferramenta experimental para a investigação biomédica. O genoma do murganho possui 2,5 mil milhões de pares de base de ADN, um pouco menos que os 2,9 mil milhões do Homem. E cerca de 99% dos nossos genes têm um homólogo no genoma do ratinho, sendo que 40% do genoma humano pode ser alinhado com o do murganho. Para além de estar bastante próximo do Homem em termos evolutivos e genéticos, o murganho torna-se um modelo ideal para o estudo de genes e doenças humanas por ter um ciclo de vida muito curto, elevada prolificidade, a sua manutenção ser pouco dispendiosa e ser possível executar técnicas de manipulação genética bastante precisas (Waterston et al., 2002).

Todas as experiências em que foram utilizados murganhos foram aprovadas pelo Comité de ética e de bem-estar da FMV-UL. Os murganhos utilizados neste trabalho foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária com luz e temperatura controlada e com comida e água *ad libitum*. O autor, acreditado pela *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) - categoria C, foi o responsável pela genotipagem e orientação dos cruzamentos para as experiências deste trabalho.

Neste trabalho, para realizar a caracterização do padrão de expressão dos membros da via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho foram utilizados murganhos da estirpe CD1. E com o objetivo de determinar a função *in vivo* do ligando Delta-Like 4 da via Notch, foi utilizada a linha de murganhos transgénicos Dll4 lox/lox CAG-Cre (S. Hayashi & McMahon, 2002).

4.1.1. Sistema binário de recombinação Cre/loxP

Os sistemas binários de manipulação génica são constituídos por dois elementos: o alvo, que flanqueia geralmente o gene cuja expressão se pretende modular, e o controlador, que atua especificamente no alvo controlando o seu estado de ativação. O sistema Cre/loxP utiliza a recombinase Cre isolada do bacteriófago P1, que catalisa a recombinação entre dois locais específicos denominados locais loxP. Os locais loxP são compostos por 34pb (incluem duas sequências de repetições invertidas de 13pb separadas por uma sequência de 8pb) e qualquer região de ADN flanqueada por estes locais é excisada devido à atividade de recombinase da proteína Cre. A orientação dos locais loxP determinam o tipo de recombinação que ocorre, se estes tiverem orientados na mesma direção o ADN que flanqueiam é removido, e se tiverem em direções opostas o ADN-alvo é invertido (Figura 10) (Jaisser, 2000; Stricklett, Nelson, & Kohan, 1999).

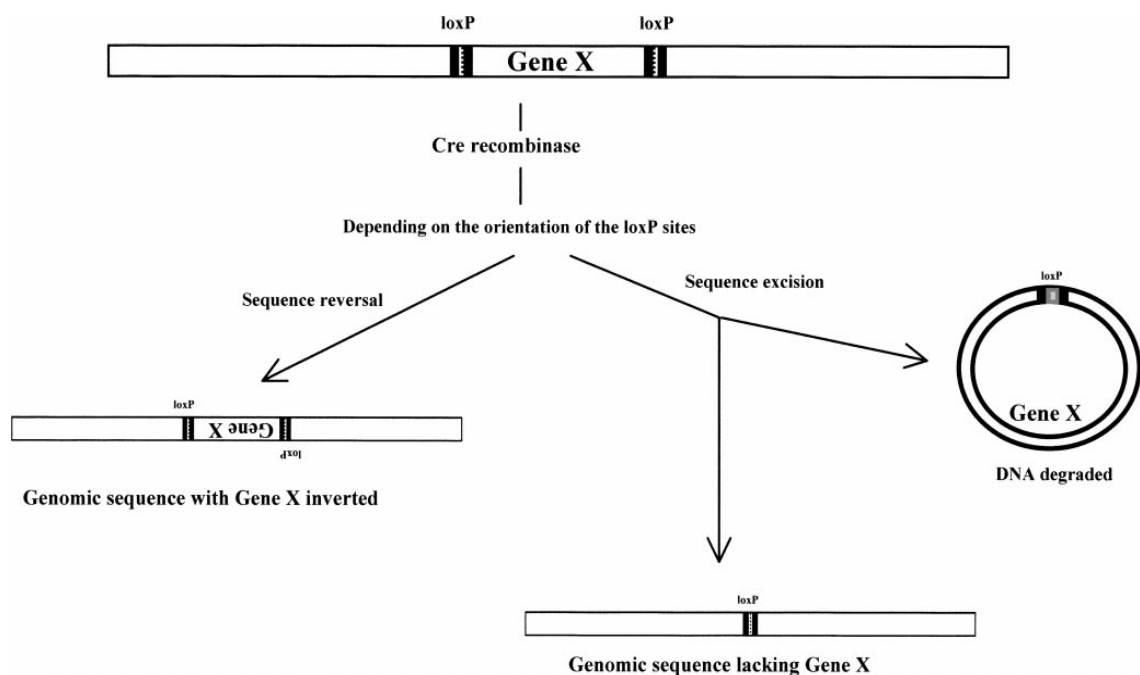


Figura 10 – Representação esquemática do funcionamento do sistema de recombinação Cre/loxP (Adaptado de Stricklett et al., 1999).

Este sistema de recombinação genética é relativamente simples e permite através do controlo da expressão da proteína Cre, um controlo espacial (através da utilização de promotores tecidulares ou celulares específicos) e/ou temporal (com sistemas

indutíveis) da remoção do ADN-alvo flanqueado pelos locais loxP. A utilização de promotores específicos permitem controlar a expressão da Cre em determinados tecidos ou células em que se pretenda analisar a perda-de-função de genes. A expressão da Cre pode, também, ser regulada temporalmente através da utilização de sistemas indutíveis, sendo particularmente vantajoso por permitir evitar as consequências adversas (efeitos tóxicos ou até mesmo letalidade) da função diminuída de um gene em estádios precoces do desenvolvimento (Jaisser, 2000; Stricklett et al., 1999).

4.1.2. Genotipagem dos murganhos transgénicos

Neste trabalho, antes da realização das experiências com os murganhos transgénicos $Dll4^{lox/lox};CAG-Cre$ procedeu-se à sua genotipagem para determinação da presença da proteína Cre.

A genotipagem tem início com a extração de ADN genómico a partir das caudas dos murganhos, seguida de uma reacção em cadeia da polimerase (PCR), e por fim é realizada a eletroforese em gel de agarose para visualização dos resultados da reacção de PCR.

Para a extração de ADN genómico a partir das caudas dos murganhos corta-se uma biópsia da cauda de cada animal com uma tesoura desinfetada e coloca-se num *eppendorf* de 1,5 mL. Cada cauda é digerida durante a noite com 20µL de proteinase K (20mg/mL) e 730µL de tampão *tail buffer* numa estufa a 55°C. No dia seguinte, a extração de ADN é realizada de acordo com o protocolo descrito no Anexo I. Depois de feita a extração de ADN genómico a partir das caudas dos murganhos, é realizada a genotipagem através de uma reacção de PCR para deteção da presença da proteína Cre, estando este protocolo descrito no Anexo II. Finalmente procede-se à eletroforese do produto de PCR em gel de agarose a 2% (v/v) com brometo de etídeo.

4.2. Recolha de embriões

Neste trabalho, para realizar a caracterização do padrão de expressão dos membros da via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho foram utilizados murganhos da estirpe CD1.

Deste modo, foram recolhidos embriões resultantes do cruzamento dos murganhos da estirpe CD1 nos seguintes estádios de desenvolvimento embrionário: 10.5dpc; 11.5dpc; 12.5dpc; 13.5dpc; 14.5dpc e 15.5dpc.

A análise de embriões durante esta janela temporal permite analisar eventos-chave no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho, como a formação da gónada bipotencial na região urogenital, e a diferenciação da gónada bipotencial em ovários e testículos.

Para a obtenção dos embriões nos estádios de desenvolvimento mencionados, os machos e as fêmeas são juntos ao fim do dia e na manhã seguinte observa-se se ocorreu cópula através da presença do rolhão vaginal. O rolhão vaginal é produzido pelas secreções das glândulas vesiculares e coagulantes do macho, podendo apresentar-se como uma estrutura de cor amarela ou branca na superfície da vagina ou um pouco mais profunda. Para a determinação do estádio de desenvolvimento embrionário considera-se que a fertilização ocorre por volta da meia-noite, num ciclo de escuridão entre as 17h e as 7h. Assim, ao meio-dia do dia seguinte, ou seja, o dia em que se observa a presença do rolhão vaginal, os embriões são datados como tendo 0.5dpc e assim sucessivamente.

As fêmeas gestantes são isoladas e sacrificadas por deslocação cervical após anestesia por injeção intraperitoneal de avertina 2% (v/v) na data correspondente ao estádio de desenvolvimento embrionário a estudar. O abdómen da fêmea é humedecido com etanol a 70% (v/v) e efetua-se uma incisão transversal no abdómen, e procede-se à extração do útero para uma placa de petri com PBS. De seguida, procede-se à individualização dos embriões, que estão cada um dentro da respetiva cripta uterina, e depois à remoção da camada muscular envolvente do útero, do tecido decidual, da placenta, saco vitelino, cordão umbilical e saco amniótico. Após a individualização dos embriões é removida uma parte de tecido embrionário que é conservado a -20°C para posteriormente ser feita a extração de ADN. O restante tecido embrionário é fixado de modo a prevenir a degradação tecidular.

Para a fixação dos embriões foi utilizada uma variante do formaldeído, o paraformaldeído. A grande vantagem deste fixador face ao formaldeído é que forma uma matriz celular menos fechada, promovendo a fixação eficiente das proteínas e retenção dos ácidos nucleicos, mas permitindo ao mesmo tempo que os anticorpos e sondas relativamente grandes consigam entrar nessa matriz celular, tornando possível a sua deteção. O tempo de fixação dos embriões foi variável de acordo com o estádio

de desenvolvimento e consequentemente do tamanho do embrião. Assim, para os embriões de 10.5dpc o tempo e fixação foi de duas horas a 4°C em paraformaldeído a 4% e para os restantes estádios de desenvolvimento os embriões foram fixados durante a noite em paraformaldeído 4% a 4°C. Após a fixação os embriões são lavados duas vezes numa solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a 4°C, e de seguida desidratados em 4% sacarose a 4°C até perda de fluidez. E, de seguida desidratados numa solução 15% sacarose a 4°C durante a noite. No dia seguinte, é feita a inclusão do embrião, à lupa, numa matriz de 7,5% de gelatina com 15% de sacarose. Os blocos de gelatina são congelados em isopentano a -80°C e armazenados a esta temperatura.

Para a avaliação da função *in vivo* do ligando Delta-like 4 durante o desenvolvimento da gónada embrionária foi utilizada a linha de murganhos transgênicos $Dll4^{lox/lox};CAG-Cre$. Os murganhos utilizados são baseados no sistema de recombinação Cre/loxP, que utiliza a recombinase Cre, uma recombinase do bacteriófago P1, que reconhece os locais loxP e catalisa a recombinação entre dois locais que flanqueiam a região de ADN-alvo, para produzir a perda-de-função do gene referido. A atividade da recombinase Cre é dependente da administração de tamoxifeno.

Deste modo, os machos, com genótipo $Dll4^{lox/lox};CAG-Cre$ +, são juntos ao fim do dia com as fêmeas, com genótipo $Dll4^{lox/lox};CAG-Cre$ -, e na manhã seguinte avalia-se a presença de rolhão vaginal. De acordo com o estágio de desenvolvimento em que se pretenda que ocorra perda-de-função embrionária, administra-se tamoxifeno às mães gestantes e procede-se à recolha dos embriões de acordo com o descrito anteriormente.

Foram analisadas durante este trabalho duas idades correspondentes a diferentes estádios de desenvolvimento embrionário: indução das fêmeas gestantes com 1,5mg de tamoxifeno aos 9.75dpc e recolha dos embriões aos 11.5dpc; e indução das fêmeas gestante com 1,5mg de tamoxifeno os 11.5dpc e recolha dos embriões aos 13.5dpc.

A dose de tamoxifeno utilizado para indução das fêmeas gestantes foi otimizado de acordo com o descrito por Hayashi & McMahon, 2002 (Protocolo de preparação de tamoxifeno no Anexo III).

4.2.1. Sexagem e genotipagem dos embriões pela técnica de PCR

Antes da análise do padrão de expressão dos membros da via de sinalização Notch pela técnica de imunofluorescência, é importante determinar o sexo do embrião, pois em algumas das idades de desenvolvimento analisadas a gónada mantém-se como uma estrutura com capacidade bipotencial, e consequentemente não é possível fazer a distinção do sexo com base na análise morfológica.

A determinação do sexo dos embriões é feita pela técnica de PCR, sendo utilizados um par de primers que amplificam numa única reação e em simultâneo uma região específica do cromossoma sexual Y e uma região do cromossoma autossómico 11, permitindo fazer a distinção entre macho (XY) e fêmea (XX) (Clapcote & Roder, 2005).

É também necessário, antes de analisar das gónadas embrionárias, determinar a presença da proteína Cre através da técnica de PCR.

Para se realizar a técnica de PCR para a sexagem e genotipagem dos embriões é necessário fazer a extração de ADN genómico a partir de tecidos embrionários recolhidos aquando da dissecação (Protocolo no Anexo IV).

O protocolo da técnica de PCR para sexagem dos embriões encontra-se descrito no Anexo V e o protocolo da reação de PCR para determinação da presença da proteína Cre no Anexo II. Depois de realizar a técnica de PCR é feita a eletroforese em gel de agarose para visualizar os resultados da reação de PCR.

4.2.2. Criosecções dos blocos de gelatina dos embriões

Os blocos de gelatina dos embriões recolhidos foram cortados no crióstato Leica CM3050S a uma temperatura de cerca de -32°C. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas adesivadas *super frost plus* de modo a que se obtivessem lâminas gêmeas dos embriões com uma espessura de 10µm. As lâminas foram congeladas a -20°C até se realizar a análise por imunofluorescência.

É importante salientar que os blocos de gelatina dos embriões são cortados tendo uma orientação sagital, e que este procedimento implica um rigoroso controlo microscópico de forma a garantir que as secções dos embriões obtidas contêm a região da gónada a analisar.

4.2.3. Análise dos embriões pela técnica de Imunofluorescência

Para realizar a técnica de imunofluorescência começa-se por descongelar as lâminas durante cerca de trinta minutos à temperatura ambiente e de seguida procede-se à desgelatinização, que é realizada colocando-se as lâminas em PBS durante quinze minutos num banho de água a 37°C. De seguida realizam-se duas lavagens de cinco minutos em PBS. Para fazer o bloqueio de ligações inespecíficas, colocam-se os embriões em solução de PBS-W com 2% de BSA durante uma hora à temperatura ambiente. Após este passo, a solução de bloqueio é substituída por uma solução de bloqueio contendo anticorpo primário de acordo com a diluição recomendada na bula, esta incubação é deixada durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as secções dos embriões são lavadas em PBS-W cinco vezes durante dez minutos. No fim das lavagens as secções são incubadas com a solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário durante uma hora à temperatura ambiente. De seguida as secções são lavadas três vezes em PBS durante dez minutos e incubadas numa solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) a 0,15%. Realizam-se duas lavagens de cinco minutos em PBS, montam-se as lâminas com mowiol e selam-se com recurso a verniz.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados.

Anticorpos Primários	Referência	Espécie	Diluição
Delta 4	ab7280 Abcam	Rabbit	1:75
Notch 1 ativado	ab8925 Abcam	Rabbit	1:100
Notch 2	ab8926 Abcam	Rabbit	1:100
Notch 3	ab23426 Abcam	Rabbit	1:100
Delta 1	ab10554 Abcam	Rabbit	1:100
Delta 3	sc-67270 Santa Cruz	Rabbit	1:50
Jagged 1	sc-8303 Santa Cruz	Rabbit	1:100

Jagged 2	sc-8158 Santa Cruz	Goat	1:50
Hes 1	ab71559 Abcam	Rabbit	1:100
Hes 2	ab134685 Abcam	Rabbit	1:100
Hes 5	ab25374 Abcam	Rabbit	1:100
PECAM	BD 55755	Rat	1:75
Sox 9	ab26414 Abcam	Rabbit	1:100
FOXL2	ab5096 Abcam	Goat	1:75
3-βHSD	sc-30820 Santa Cruz	Goat	1:150

Tabela 2- Anticorpos secundários utilizados.

Espécie	Diluição	Fluorocromo
Goat anti-rat	1:400	594nm
Donkey anti-rabbit	1:400	488nm
Donkey anti-goat	1:400	488nm
Donkey anti-rat	1:400	594nm
Chicken anti-goat	1:400	488nm

4.2.4. Análise dos embriões por microscopia de fluorescência

As imagens de fluorescência das secções dos embriões foram capturadas pela câmara monocromática Leica DC350F que se encontra acoplada ao microscópio de epifluorescência Leica DM5000B. As imagens obtidas foram processadas com recurso ao programa Adobe Photoshop CS5.

5. Resultados

5.1. Caracterização do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho

Para fazer a caracterização do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho foram recolhidos embriões resultantes do cruzamento dos murganhos da estirpe CD1 nos seguintes estádios de desenvolvimento embrionário: 10.5dpc; 11.5dpc; 12.5dpc; 13.5dpc; 14.5dpc e 15.5dpc. As gónadas dos embriões recolhidos foram analisadas por imunofluorescência, tendo sido utilizados anticorpos para detetar membros da via Notch, que foram co-localizados com o anticorpo anti-PECAM. A co-marcação para PECAM permite identificar a vasculatura embrionária, bem como as células da linha germinativa que estão presentes na gónada desde o início da sua formação.

5.1.1. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 10.5dpc

Na gónada embrionária de 10.5dpc de fêmea observa-se que o ligando Dll4 é expresso nas células germinativas (identificadas a verde pelo PECAM). Aos 10.5dpc observa-se, também, a expressão do recetor Notch1 em células germinativas. Aos 10.5dpc no macho observa-se a expressão do ligando Dll4 nas células da linhagem germinativa (Figura 11).

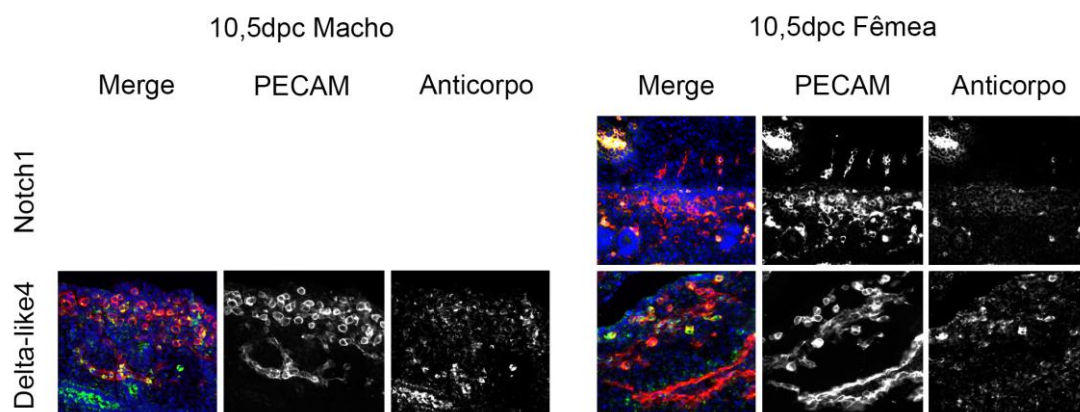


Figura 11 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do recetor Notch 1 e ligando Dll4 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 10.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1 e Dll4 a verde. Ampliação 20x.

5.1.2. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 11.5dpc

Na gónada embrionária de 11.5dpc de macho observa-se que as células da linha germinativa, identificadas pela marcação contra PECAM, expressam os recetores Notch1 e Notch2, mas não se observa expressão do recetor Notch3. Aos 11.5dpc no macho estão também presentes os ligandos Dll3, Dll4 e Jag2, não se identificando a presença dos ligandos Dll1 e Jag1 (Figura 12).

Na gónada embrionária de 11.5dpc de fêmea observa-se a expressão dos recetores Notch3 e dos ligandos Dll1, Dll4 e Jag2 nas células da linha germinativa que constituem a gónada neste estágio de desenvolvimento embrionário. Os recetores Notch1 e Notch2 e os ligandos Dll3 e Jag1 não estão presentes na gónada embrionária da fêmea nesta fase de desenvolvimento (Figura 12).

Analisando o padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5, observa-se que estes estão presentes nas gónadas embrionárias de 11.5dpc de macho e de fêmea (Figura 13).

Na gónada embrionária de macho e fêmea aos 11.5dpc observam-se algumas células marcadas a verde e vermelho (figura 12 e 13), que correspondem aos eritroblastos nucleados que estão presentes nesta fase do desenvolvimento. A marcação observada nestas células corresponde a autofluorescência e não deve ser confundida com marcação dos anticorpos analisados.

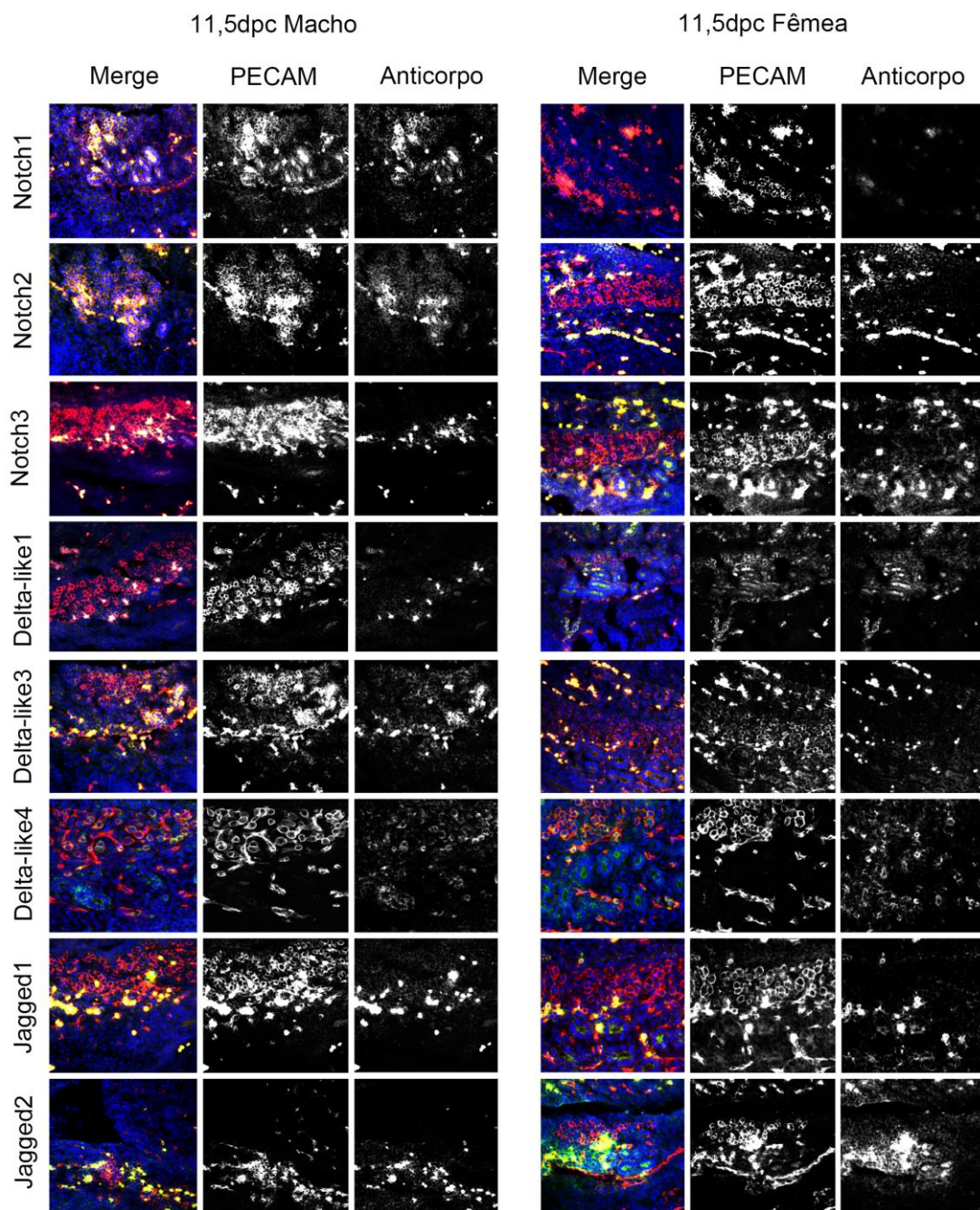


Figura 12 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 11.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1, Notch 2; Notch3;Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1;Jag2 a verde. Ampliação 20x.

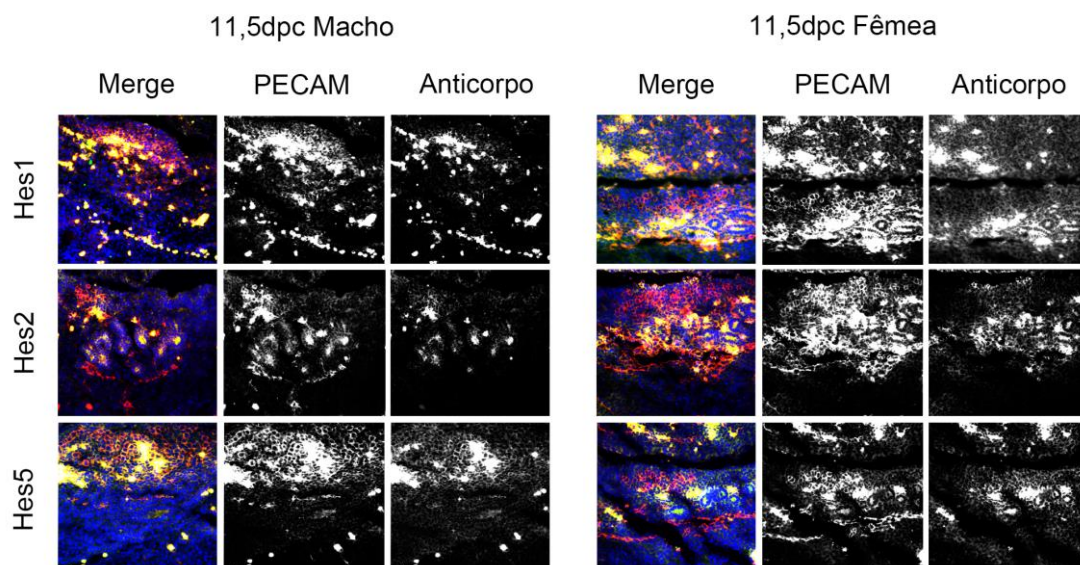


Figura 13 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 11.5dpc. PECAM a vermelho, Hes1, Hes2 e Hes5 a verde. Ampliação 20x.

5.1.3. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 12.5dpc

Aos 12.5dpc de desenvolvimento embrionário observam-se uma série de alterações morfológicas na gónada masculina, desencadeadas pela expressão do gene Sry. Na análise das lâminas de imunofluorescência para caracterização da expressão dos membros da via Notch foi possível observar a morfologia específica da gónada masculina, identificando-se os cordões testiculares, o compartimento intersticial, e a vasculatura específica da gónada. Neste estágio de desenvolvimento embrionário torna-se, assim, possível a identificação do sexo do embrião com base na observação da morfologia da gónada.

Aos 12.5dpc no macho foi possível identificar a expressão dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3 em células do compartimento intersticial e em algumas células germinativas dos cordões testiculares. Os ligandos Dll1 e Dll3 estão presentes em células intersticiais e em grande parte das células germinativas que constituem os cordões testiculares. O ligando Dll4 é detetado essencialmente em células intersticiais, embora também esteja presente em algumas células germinativas. Os ligandos Jag1 e Jag2 estão presentes em células intersticiais e em muitas das células germinativas dos cordões testiculares da gónada masculina (Figura 14).

Aos 12.5dpc na fêmea os recetores Notch1, Notch2, Notch3 e o ligando Dll1 estão presentes em algumas células germinativas. Os ligandos Dll3 e Dll4 estão presentes em muitas células germinativas da gónada embrionária. O ligando Jag1 é expresso de forma bastante intensa em algumas células germinativas, e o ligando Jag2, também, está presente em algumas células germinativas da gónada de fêmea (Figura 14). Os efetores Hes1 e Hes2 são expressos de forma bastante intensa nas células intersticiais da gónada masculina aos 12.5dpc, e estão presentes nas células germinativas dos cordões testiculares. Aos 12.5dpc no macho, Hes5 é detetado nas células do compartimento intersticial (Figura 15).

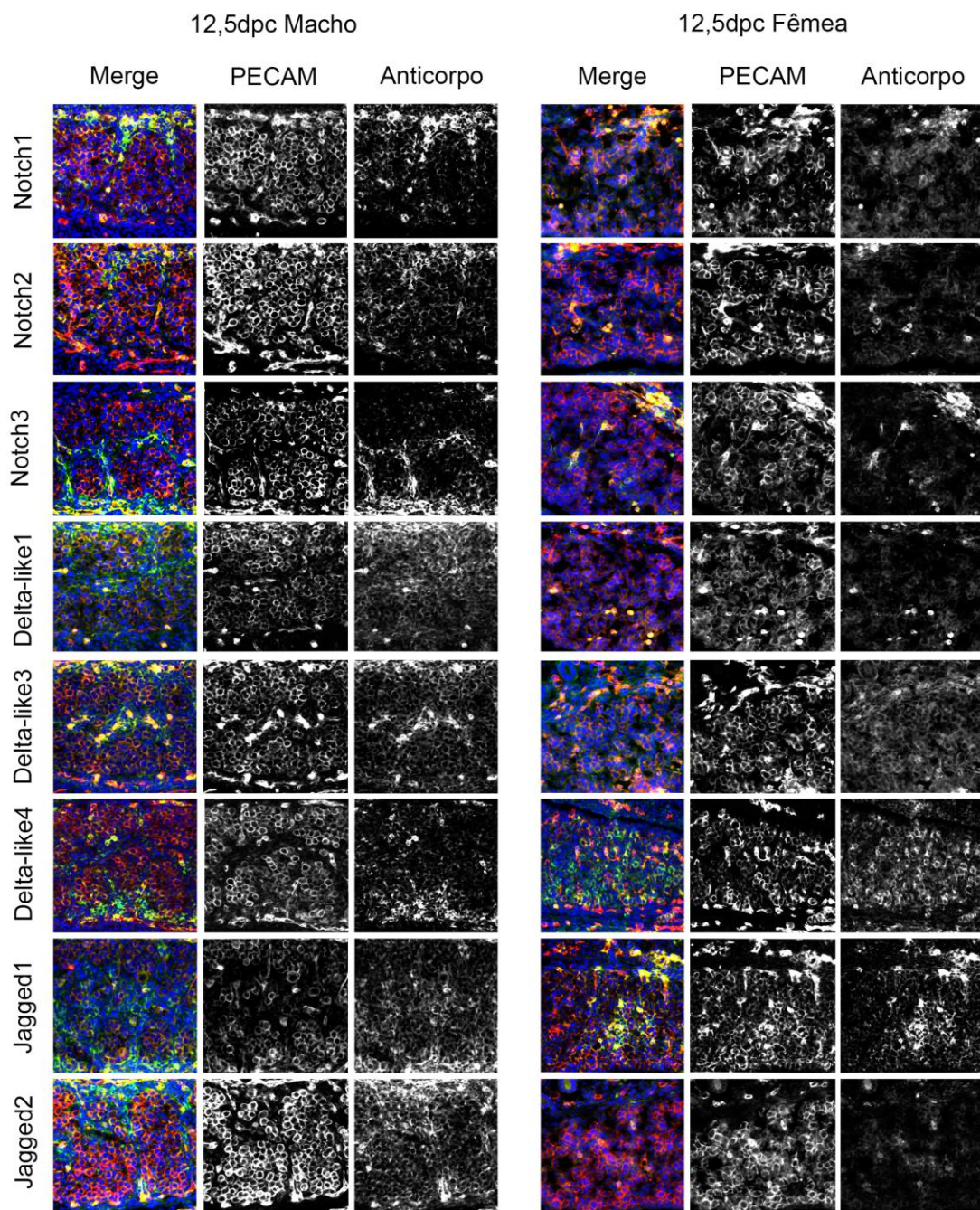


Figura 14 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 12.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1, Notch 2; Notch3;Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1;Jag2 a verde. Ampliação 20x.

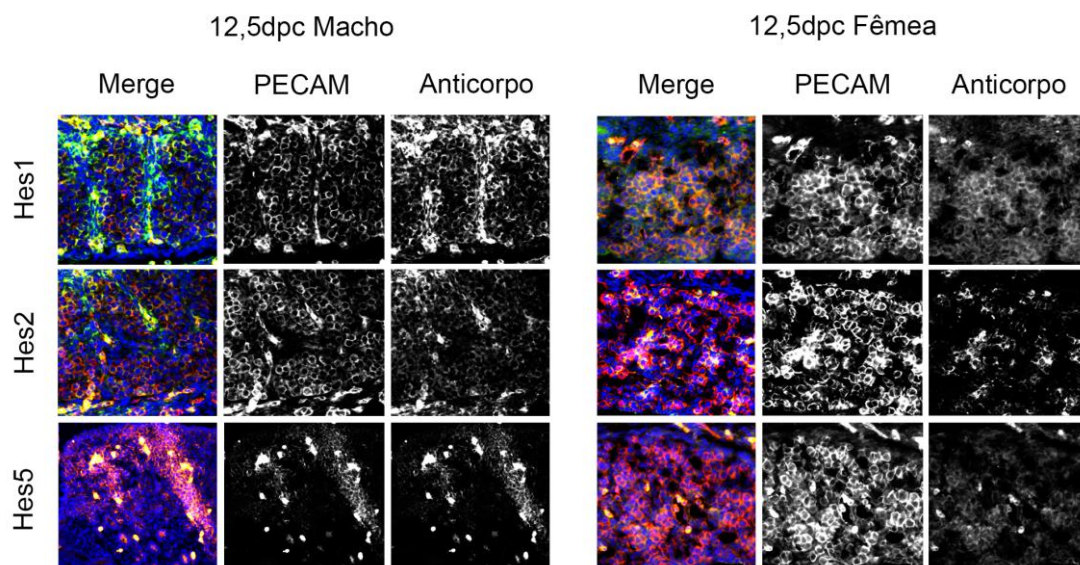


Figura 15 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 12.5dpc. PECAM a vermelho, Hes1, Hes2 e Hes5 a verde. Ampliação 20x.

5.1.4. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 13.5dpc

Na gónada embrionária de 13.5dpc de macho os recetores Notch1, Notch2 e Notch3 estão presentes em células intersticiais e em algumas células germinativas. Os ligandos Dll1 e Dll3 estão localizados em células intersticiais e em muitas das células germinativas que constituem os cordões testiculares. O ligando Dll4 está presente em células intersticiais da gónada masculina e em algumas células germinativas. Os ligandos Jag1 e Jag2 estão localizados nas células intersticiais e em células germinativas da gónada de macho aos 13.5dpc (Figura 16).

Aos 13.5dpc na fêmea pode observar-se que os recetores Notch1 e Notch3 e os ligandos Dll1 e Jag2 estão presentes na maioria das células germinativas da gónada. O recetor Notch2 e os ligandos Dll4 e Jag1 também estão presentes na gónada de fêmea nesta fase do desenvolvimento embrionário, embora estejam presentes num menor número de células germinativas. O ligando Dll3 está presente apenas num pequeno número de células germinativas da gónada feminina (Figura 16).

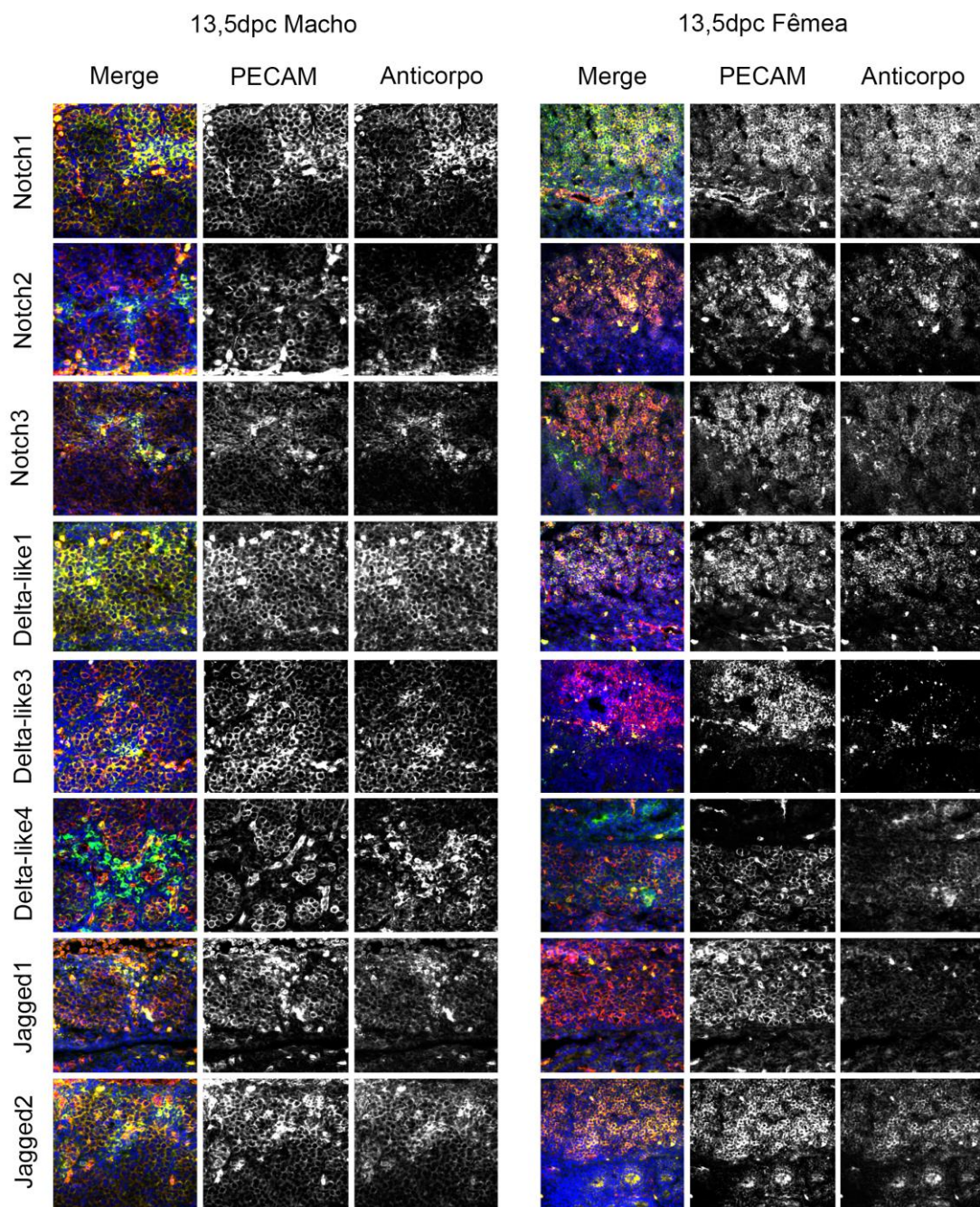


Figura 16 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 13.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1, Notch 2; Notch3;Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1;Jag2 a verde. Ampliação 20x.

Os efetores Hes1 e Hes5 estão presentes em células intersticiais e em células germinativas dos cordões testiculares da gônada embrionária de macho aos 13.5dpc. Hes2 localiza-se essencialmente nas células intersticiais da gônada masculina, estando presente apenas em algumas células da linhagem germinativa (Figura 17). Aos 13.5dpc na fêmea observa-se que Hes2 está presente na maioria das células germinativas da gônada, enquanto Hes1 e Hes5 está presente apenas em algumas das células da linhagem germinativa (Figura 17).

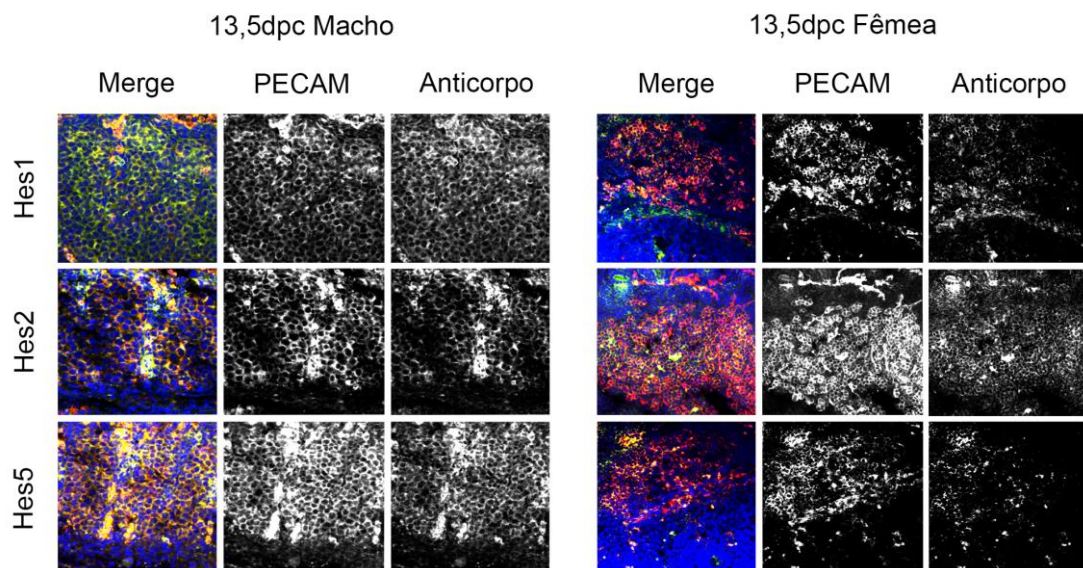


Figura 17 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gônadas embrionárias de macho e fêmea de 13.5dpc. PECAM a vermelho, Hes1, Hes2 e Hes5 a verde. Ampliação 20x.

5.1.5. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gônada embrionária de 14.5dpc

Na gônada embrionária de macho aos 14.5dpc os recetores (Notch1, Notch2 e Notch3) e ligandos (Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 e Jag2) da via de sinalização Notch que foram analisados neste trabalho localizam-se principalmente em células intersticiais, embora também estejam presentes em algumas células germinativas (Figura 18). Aos 14.5dpc na fêmea observa-se a presença dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3 e dos recetores Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 e Jag2 nas células da linhagem germinativa (Figura 18).

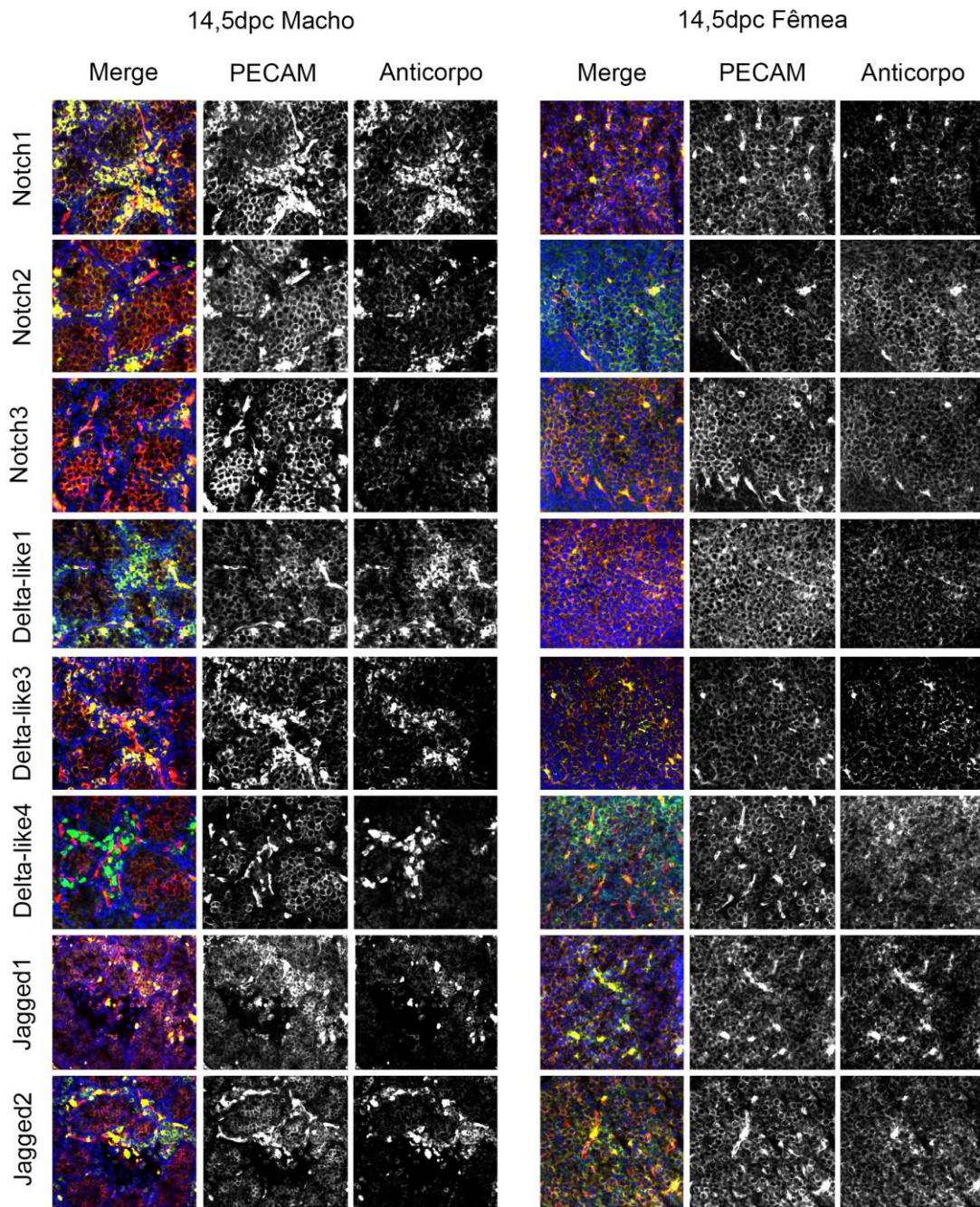


Figura 18 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch 1, Notch 2 e Notch3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 14.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1, Notch 2; Notch3;Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1;Jag2 a verde. Ampliação 20x.

Os efetores Hes1, Hes2 e Hes5 encontram-se localizados especificamente nas células do compartimento intersticial da gónada masculina aos 14.5dpc. Na gónada embrionária da fêmea aos 14.5dpc os efetores Hes1, Hes2 e Hes5 estão presentes nas células da linha germinativa (Figura 19).

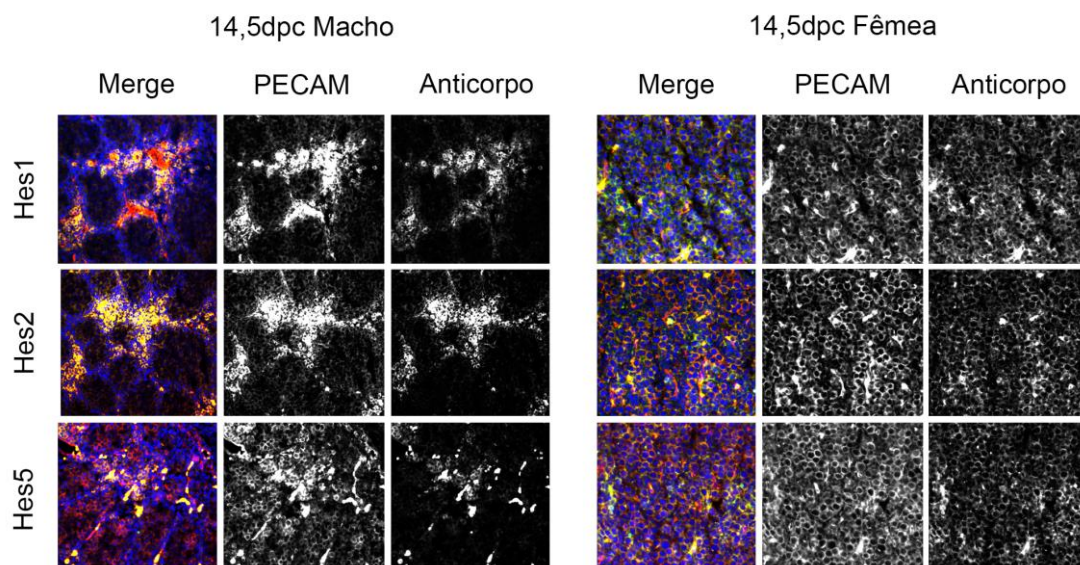


Figura 19 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 14.5dpc. PECAM a vermelho, Hes1, Hes2 e Hes5 a verde. Ampliação 20x.

5.1.6. Padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada embrionária de 15.5dpc

Na gónada embrionária de macho aos 15.5dpc os recetores Notch1 e Notch2 localizam-se principalmente em células do compartimento intersticial, estando também presentes em algumas células germinativas dos cordões testiculares. Aos 15.5dpc no macho, Notch3 está presente na maioria das células germinativas e em algumas células intersticiais. Os ligandos Dll1, Dll3, Dll4 e Jag1 localizam-se principalmente em células intersticiais, e em algumas células germinativas. O ligando Jag2 está presente na maioria das células da linhagem germinativa dos cordões testiculares e em algumas células presentes no interstício da gónada de macho aos 15.5dpc (Figura 20).

Aos 15.5dpc na fêmea todos os recetores e ligandos da via de sinalização Notch que foram analisados neste trabalho estão presentes nas células germinativas (Figura 20).

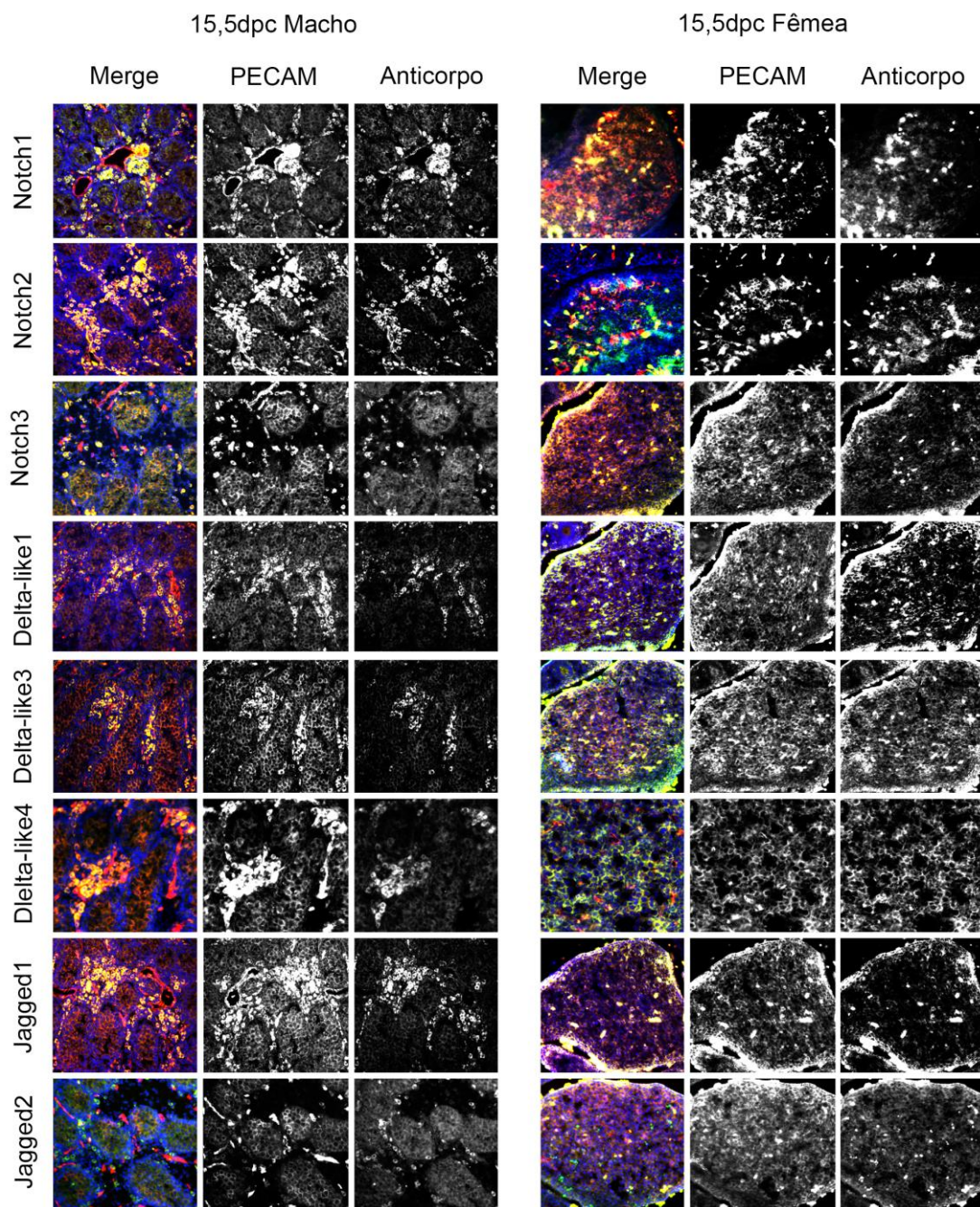


Figura 20 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos recetores Notch1, Notch2 e Notch3; ligandos Dll1, Dll3, Dll4, Jag 1 e Jag2 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 15.5dpc. PECAM a vermelho, Notch 1, Notch 2; Notch3;Dll1, Dll3, Dll4, Jag1;Jag2 a verde. Ampliação 20x.

Aos 15.5dpc no macho, Hes1 está presente em algumas células intersticiais e em algumas células germinativas, Hes2 localiza-se nas células intersticiais, e Hes5 está presente nas células intersticiais e na maioria das células germinativas dos cordões testiculares (Figura 21).

Aos 15.5dpc na fêmea observa-se a presença dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 em células germinativas (Figura 21).

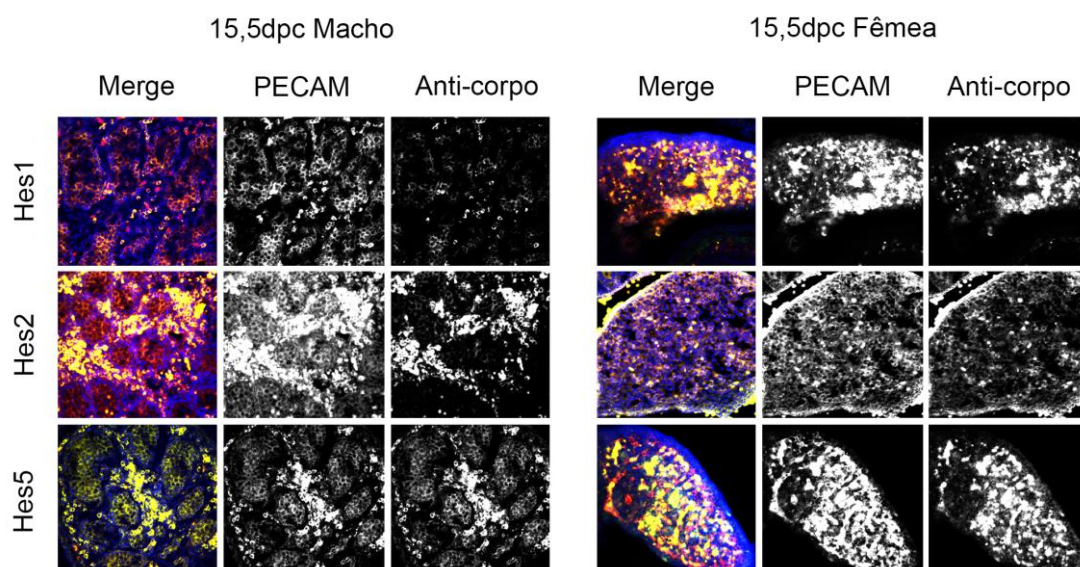


Figura 21 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5 nas gónadas embrionárias de macho e fêmea de 15.5dpc. PECAM a vermelho, Hes1, Hes2 e Hes5 a verde. Ampliação 20x.

5.1.7. Co-localização do ligando Dll4 e 3 β -HSD na gónada embrionária macho

O compartimento intersticial da gónada masculina é composta maioritariamente por células intersticiais, que segregam androgénios, essenciais para a espermatogénese, competência reprodutiva e manutenção das características sexuais masculinas secundárias. No entanto, o interstício testicular é também composto por células de Leydig, células endoteliais, fibroblastos e células sanguíneas, compondo o estroma da gónada masculina. Durante o desenvolvimento da gónada embrionária de macho observou-se, neste trabalho, que a expressão do ligando Dll4 se torna específica das células intersticiais da gónada a partir dos 12.5dpc (Figuras 14,16,18 e 20).

Para identificar as células do compartimento intersticial que expressam o ligando Dll4, este foi co-localizado com o 3 β -HSD, um marcador das células intersticiais de Leydig. Observou-se, então, que na gónada embrionária de macho aos 13.5dpc, 14.5dpc e 15.5dpc as células intersticiais que expressam o ligando Dll4 são marcadas pelo 3 β -HSD, tratando-se de células intersticiais de Leydig (Figura 22).

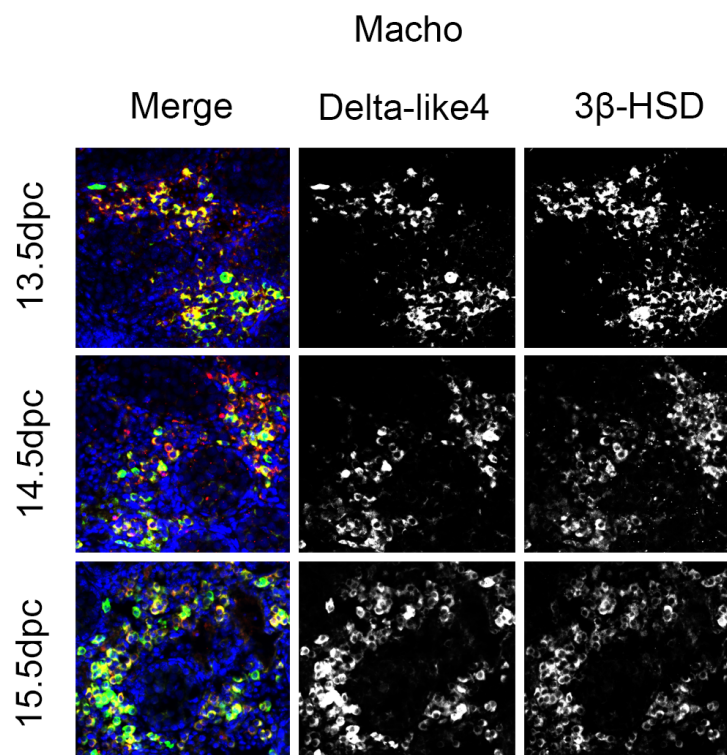


Figura 22 - Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 e do marcador 3 β -HSD nas gónadas embrionárias de macho de 13.5dpc, 14.5dpc e 15.5dpc. Dll4 a vermelho e 3 β -HSD a verde. Ampliação 20x.

5.2. Estudo *in vivo* da função do ligando Delta-Like 4 no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho

5.2.1. Otimização da dose de tamoxifeno para indução das fêmeas gestantes

Para fazer o estudo da função *in vivo* do ligando Dll4 no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho utilizámos a linha de murganhos transgênicos Dll4^{lox/lox};CAG-Cre-ERT2. Esta linha de murganhos expressa a proteína Cre de forma ubíqua, permitindo regular temporalmente a sua atividade recombinatória em todos os tecidos de murganhos adultos e de embriões em desenvolvimento. A atividade da recombinase Cre é dependente da administração de tamoxifeno aos murganhos. A dose administrada foi otimizada de acordo com o descrito por S. Hayashi & McMahon, 2002. Foram testadas as seguintes doses de tamoxifeno: 6mg/40g (peso corporal); 3mg/40g; 2mg/40g e 1.5mg/40g.

Assim, os murganhos masculinos, com genótipo Dll4^{lox/lox};CAG-Cre⁺, foram juntos ao fim do dia com os murganhos fêmea, com genótipo Dll4^{lox/lox};CAG-Cre⁻, e na

manhã seguinte avaliou-se a presença de rolhão vaginal. As administrações intraperitoneais de tamoxifeno foram feitas às mães gestantes aos 11.5dpc e aos 13.5dpc, 48 horas após a administração, foram recolhidos os embriões para análise. As fêmeas induzidas com 6mg, 3mg e 2mg morreram no dia a seguir à administração de tamoxifeno, revelando-se estas doses letais para os murganhos. Contudo, as fêmeas induzidas com 1,5mg de tamoxifeno sobreviveram e foi feita a recolha de embriões aos 13.5dpc de seis fêmeas. A análise destes embriões está descrita no ponto 4.2.2.

5.2.2. Estudo *in vivo* da função do ligando Delta-Like 4

As fêmeas gestantes com embriões de 11.5dpc foram induzidas com administração intraperitoneal de 1,5mg/40g de tamoxifeno e 48 horas após esta indução foram sacrificadas, tendo sido recolhidos os embriões de 13.5dpc para análise. A escolha desta janela temporal para indução das fêmeas e recolha de embriões deve-se ao facto de o ligando Dll4 se encontrar presente na gónada feminina e masculina desde os 10.5dpc nas células da linha germinativa, e a partir de 12.5dpc na gónada masculina a presença deste ligando torna-se específica das células intersticiais de Leydig (Figuras 11,12,14,16,18 e 20).

Aquando da dissecação das fêmeas gestantes e recolha dos embriões observou-se que parte destes apresentavam uma aparência morfológica compatível com a idade de desenvolvimento (Figura 23, direita), contudo, alguns dos embriões recolhidos apresentavam dimensões menores, atraso no desenvolvimento dos membros, e hemorragias em algumas regiões do corpo (Figura 23; esquerda).



Figura 23 - Análise macroscópica dos embriões recolhidos.

Os embriões recolhidos foram genotipados para a determinação do sexo e presença do transgene CAG-Cre-ERT2, e posteriormente processados e analisados pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e pela técnica de imunofluorescência.

A análise das gónadas embrionárias com a coloração HE permitiu observar a morfologia das gónadas dos embriões de 13.5dpc. Observando as gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos, constata-se que não existem diferenças morfológicas aparentes entre as gónadas dos animais controlo e dos animais induzidos, e que esta morfologia é compatível com o descrito para os embriões de 13.5dpc (Figura 24).

Macho E13.5

Controlo

Induzido

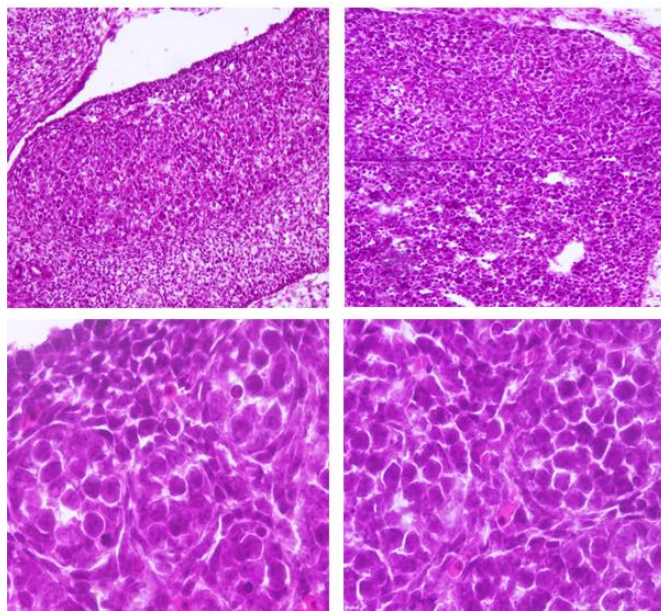


Figura 24 – Coloração de hematoxilina-eosina nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos. Ampliação 10x e 20X.

A análise das gónadas embrionárias com a coloração HE das fêmeas controlo e induzidas permitiu observar que não existem diferenças morfológicas aparentes entre as gónadas dos animais, e que a morfologia observada é compatível com o descrito para os embriões de fêmea nesta fase de desenvolvimento (Figura 25).

Fêmea E13.5

Controlo

Induzido

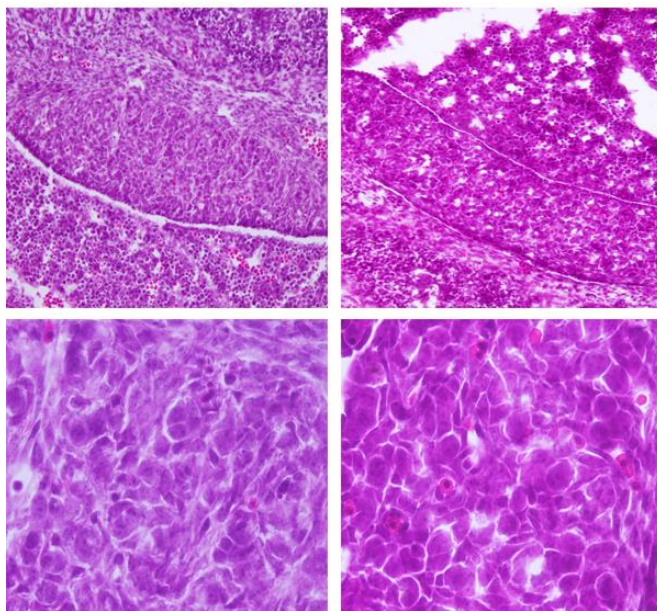


Figura 25 - Coloração de Hematoxilina-eosina nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos. Ampliação 10x e 20X.

A partir da análise por imunofluorescência da gónada embrionária dos machos controlo pode-se constatar que o ligando Dll4 está presente principalmente nas células intersticiais da gónada e em algumas células germinativas dos cordões testiculares (Figura 26). Na gónada dos machos induzidos o padrão de expressão do ligando Dll4 é igual ao dos machos controlo, ou seja, o ligando está presente nas células intersticiais e em algumas células germinativas. A análise do padrão de expressão do ligando Dll4 nos embriões controlos e induzidos permitiu observar que não existem diferenças neste padrão de expressão entre os embriões, sendo este igual ao obtido na análise dos embriões de estirpe CD1 da mesma fase do desenvolvimento embrionário (Figura 16).

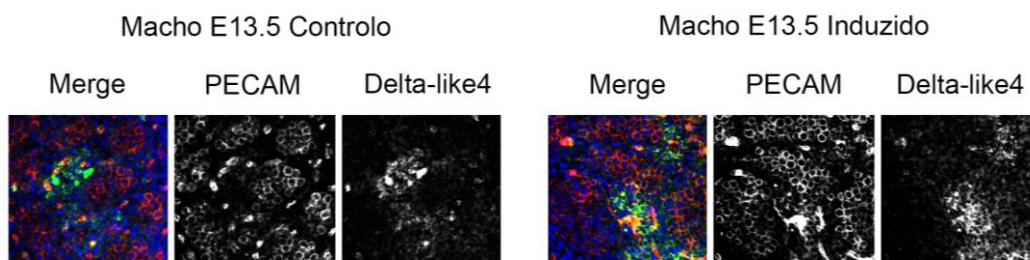


Figura 26 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 nas gónadas embrionárias dos machos controlo e induzidos. PECAM a vermelho; Dll4 a verde; ampliação 20X.

Deste modo, não se observaram diferenças no padrão de expressão do ligando Dll4 entre as gónadas dos machos induzidos e controlo, e procedeu-se de seguida a uma análise das mesmas utilizando marcadores celulares específicos.

O Sox9 é um marcador das células de sertoli, que se encontra presente (a verde) na gónada embrionária do macho controlo e induzido nestas células, observando-se na periferia dos cordões testiculares (Figura 27).

O 3 β -HSD é um marcador das células intersticiais de Leydig e encontra-se presente na gónada embrionária dos machos controlo e induzidos (a verde) na região intersticial, entre os cordões testiculares (Figura 27).

O FOXL-2 é um marcador das células do ovário, não se observando marcação do mesmo nas células da gónada masculina dos animais controlo nem dos animais induzidos (Figura 27).

A análise da marcação dos anticorpos Sox9, 3 β -HSD e FOXL2 permitiu observar que não existem diferenças no padrão de marcação destes anticorpos entre os machos induzidos e controlo, para além de a marcação ser observada nas células em que seria expectável.

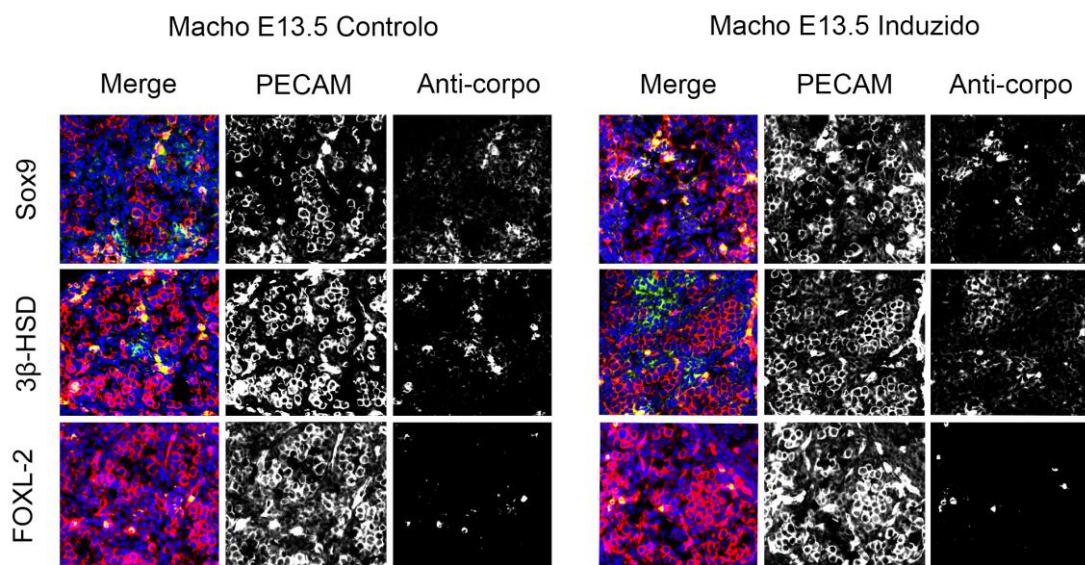


Figura 27 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos marcadores Sox9; 3β-HSD e FOXL-2 nas gónadas embrionárias dos machos controlos e induzidos. PECAM a vermelho, Sox9; 3β-HSD e FOXL-2 a verde; ampliação 20X.

Analisando o padrão de marcação do ligando Dll4 na gónada embrionária das fêmeas, observa-se que o ligando está presente nas células germinativas da fêmea controlo, bem como na fêmea induzida, não existindo diferenças entre as gónadas femininas de animais controlo e induzido (Figura 28). É de salientar que para além de não existirem diferenças entre os animais induzidos e controlos, o padrão de marcação deste ligando é igual ao obtido na análise dos embriões de estirpe CD1 da mesma fase do desenvolvimento embrionário (Figura 16).

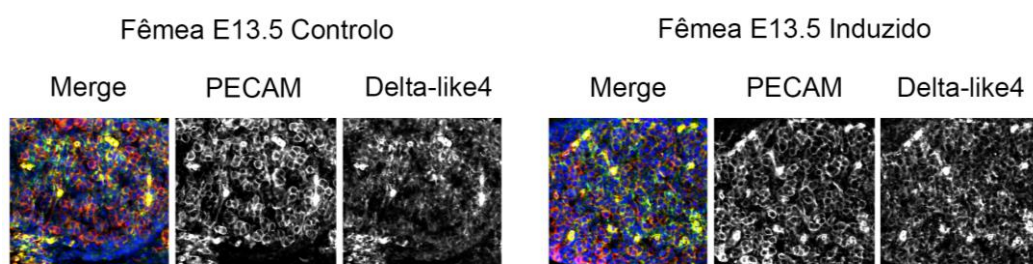


Figura 28 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão do ligando Dll4 nas gónadas embrionárias das fêmeas controlos e induzidos. PECAM a vermelho, Dll4 a verde; ampliação 20X.

Após a análise do padrão de expressão do ligando Dll4 nas gónadas embrionárias de fêmea controlo e induzido, procedeu-se à análise da expressão dos marcadores celulares Sox-9, 3 β -HSD e FOXL-2.

Os anticorpos Sox-9 e 3 β -HSD são marcadores de células específicas da gónada masculina (células de sertoli e células de Leydig, respetivamente), deste modo, não seria de esperar observar marcação destes anticorpos na gónada feminina controlo. Para além de não se ter observado marcação na gónada feminina controlo, estes marcadores estão ausentes na gónada feminina induzida (Figura 29).

O anticorpo FOXL-2 está presente nas células germinativas da gónada feminina de controlo, bem como na gónada induzida (Figura 29).

A análise do padrão de marcação destes anticorpos permitiu observar que não existem diferenças entre as fêmeas induzidas e controlo, e o padrão e localização da marcação dos anticorpos Sox-9, 3 β -HSD e FOXL-2 corresponde ao expectável.

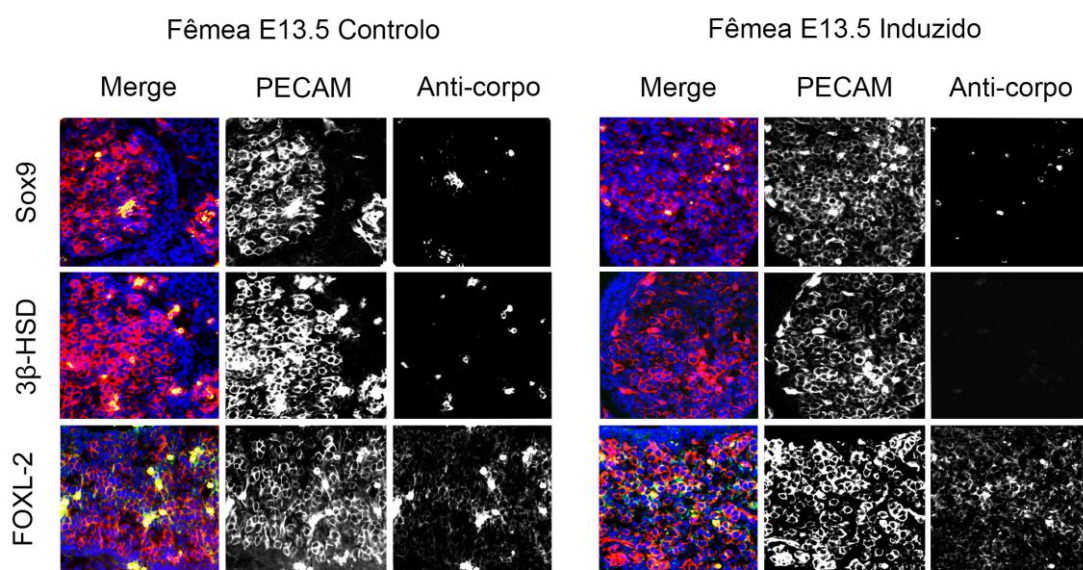


Figura 29 – Análise por imunofluorescência do padrão de expressão dos marcadores Sox9; 3 β -HSD e FOXL-2 nas gónadas embrionárias das fêmeas controlo e induzidas. PECAM a vermelho, Sox9; 3 β -HSD e FOXL-2 a verde; ampliação 20X.

Para aprofundar o estudo *in vivo* da função do ligando Dll4 na formação da gónada embrionária do murganho decidiu-se induzir fêmeas gestantes com 1,5mg de tamoxifeno aos 9.75dpc e recolher os embriões para análise aos 11,5dpc. A escolha desta janela temporal para indução das fêmeas e recolha de embriões deve-se ao

facto de o ligando Dll4 se encontrar presente na gónada feminina e masculina desde os 10.5dpc nas células da linha germinativa (Figura 11), e permite avaliar se o ligando Dll4 está envolvido no processo de formação da gónada bipotencial. Contudo, não foi possível obter embriões desta fase de desenvolvimento embrionário para análise.

6. Discussão

A via de sinalização celular Notch é um mecanismo molecular conservado em termos evolutivos que regula o destino celular em vários sistemas, tanto na embriogénese como na idade adulta. No sistema reprodutor adulto masculino e feminino, o envolvimento desta via encontra-se descrito em diversos processos (Johnson et al., 2001; D Murta et al., 2014; Trombly et al., 2009; Vorontchikhina et al., 2005; Xu & Gridley, 2013; Zhang et al., 2011; Dirami, Ravindranath, Achi, & Dym, 2001; T. Hayashi et al., 2001; Mori, Kadokawa, Hoshinaga, & Marunouchi, 2003; Daniel Murta et al., 2013).

A nível embrionário, a expressão de alguns componentes e efetores da via Notch já foi descrita na gónada masculina entre os 11.5dpc e os 13.5dpc (Tang et al., 2008). Tang e colegas sugerem que a via Notch terá um papel na regulação das células de Leydig fetais. Mais tarde DeFalco e colegas demonstraram que o envolvimento da via Notch na manutenção da população de células de Leydig fetais seria através do ligando Jagged1 (Defalco et al., 2013).

A presença e possível função de Notch no testículo durante o período pós-natal foram descritas por Daniel Murta et al., 2013; Hasegawa, Okamura, & Saga, 2012; T. Hayashi et al., 2001; Dirami et al., 2001.

Componentes da via Notch estão, também, presentes no ovário pós-natal e adulto e alguns autores demonstraram o papel da via Notch na foliculogénese (Johnson et al., 2001; D Murta et al., 2014; Trombly et al., 2009; Vorontchikhina et al., 2005; Zhang et al., 2011).

Contudo, a informação acerca da presença e potencial função desta via na gónada embrionária é escassa e dispersa (Garcia et al., 2013; Garcia & Hofmann, 2013b; Xu & Gridley, 2013).

Este trabalho pretendeu aprofundar o conhecimento acerca do envolvimento da via de sinalização Notch na gónada embrionária, tendo como objetivos analisar o padrão de expressão dos membros da via Notch durante o desenvolvimento da gónada embrionária do ratinho, e avaliar a função do ligando Dll4 durante este processo. Esta análise, no global, tinha por objetivo estimar o potencial de a via de sinalização Notch ser relevante no desenvolvimento da gónada embrionária e no processo de determinação do sexo.

A análise do padrão de expressão da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho envolveu a análise de gónadas de macho e fêmea aos 10.5dpc;11.5dpc;12.5dpc;13.5dpc; 14.5dpc e15.5dpc.

Na análise das gónadas embrionárias aos 10.5dpc só foi possível identificar a presença do ligando Dll4 na gónada de macho e o recetor Notch1 e o ligando Dll4 na gónada feminina (Figura 11). A dificuldade na obtenção de secções de gónada aos 10.5dpc deve-se ao facto de nesta idade a gónada estar a iniciar a sua formação na região urogenital, sendo composta apenas por algumas células da linhagem germinativa. Deste modo não foi possível obter mais animais para analisar a expressão dos restantes componentes da via neste estágio de desenvolvimento. Porém, foi possível observar a presença de alguns membros da via (recetor Notch1 e ligando Dll4), cuja presença não tinha sido anteriormente descrita na gónada embrionária nesta fase de desenvolvimento.

Aos 11.5dpc foi possível proceder à análise de todos os marcadores da via Notch disponíveis neste estudo, tendo-se observado na gónada de macho a expressão dos recetores Notch1 e Notch2 e dos ligandos Dll3, Dll4 e Jagged2. Na gónada de fêmea aos 11.5dpc observou-se a expressão do recetor Notch3 e dos ligandos Dll1, Dll4 e Jagged2. Aos 11.5dpc nas gónadas embrionárias de macho e de fêmea observou-se, ainda, a expressão dos efetores Hes1, Hes2 e Hes5, indicando que a via de sinalização Notch se encontra ativa.

A partir dos 12.5dpc, todos os recetores, ligandos e efetores da via Notch que foram analisados são expressos na gónada embrionária de macho e de fêmea (Tabela 3). Contudo, na gónada embrionária de macho a partir dos 12.5dpc observa-se que a expressão dos membros da via Notch se localiza principalmente nas células presentes no compartimento intersticial, embora também sejam expressos em algumas células germinativas que constituem os cordões testiculares. Na gónada de fêmea aos 12.5dpc observa-se a expressão de todos os membros da via que foram analisados, mas é de salientar que os ligandos Dll3 e Dll4 estão presentes num maior número de células germinativas da gónada (Figura 14).

Aos 13.5dpc na gónada de macho observa-se a expressão dos recetores, ligandos e efetores que foram analisados, com localização principalmente nas células intersticiais (Figura 16). Na gónada feminina também se observa a expressão de todos os membros da via analisados, salientando-se o facto de o ligando Dll3 estar presente num menor número de células germinativas da gónada (Figura 16).

Aos 14.5dpc e 15.5dpc os membros e os efetores da via continuam presentes nas gónadas embrionárias de macho e de fêmea. Na gónada de macho, os recetores, ligandos e efetores continuam localizados em células do compartimento intersticial. Durante o desenvolvimento da gónada embrionária de macho observou-se, então, que a expressão dos ligandos, recetores e efetores da via Notch se torna específica de células intersticiais desde os 12.5dpc. Embora o compartimento intersticial seja composto maioritariamente por células de Leydig, existem também células endoteliais, fibroblastos e células sanguíneas, sendo importante analisar quais as células do compartimento intersticial que expressam os membros da via Notch. Neste sentido, foi feita a co-localização do ligando Dll4 com 3β -HSD, um marcador das células intersticiais de Leydig, nas gónadas de machos aos 13.5dpc, 14.5dpc e 15.5dpc. Observou-se que as células intersticiais de Leydig, identificadas pelo 3β -HSD, expressam o ligando Dll4 (Figura 22). Este resultado é semelhante ao descrito anteriormente na bibliografia relativamente à expressão de outros membros da via Notch nas células de Leydig da gónada embrionária de macho (Defalco et al., 2013; Tang et al., 2008). Este resultado é sugestivo de que a via Notch terá um papel na regulação das células fetais de Leydig na gónada embrionária de macho. Neste trabalho não foi possível fazer a co-localização dos restantes membros da via observados na gónada de macho com o marcador de células de Leydig 3β -HSD, no entanto, em trabalhos futuros será importante fazer esta avaliação. Assim, o objetivo deste trabalho de analisar o padrão de expressão dos membros da via Notch durante o desenvolvimento da gónada embrionária do ratinho foi cumprido. Embora já tivesse sido anteriormente descrito por alguns autores a presença de alguns membros desta via na gónada embrionária de macho, este trabalho permitiu uma abordagem mais completa da via Notch, analisando o padrão de expressão dos seus membros ao longo do desenvolvimento da gónada. Permitindo, deste modo, uma análise mais completa da via Notch durante o desenvolvimento da gónada masculina e feminina. Não foi possível completar a análise do padrão de expressão dos membros da via Notch na gónada aos 10.5dpc, mas em estudos futuros será bastante importante completar esta análise para que se possa observar quais os recetores e ligandos da via que se encontram presentes na gónada no início da sua formação na região urogenital.

Tabela 3 – Esquema síntese do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho. N1 – Notch1; N2- Notch2; N3 – Notch3; D1- Dll1; D3 – Dll3; D4- Dll4; J1- Jag1; J2-Jag2;H1-Hes1; H2-Hes2; H5 – Hes5. A negrito estão identificados os membros mais expressos.

Idade	Membros	Macho	Fêmea
Embrionária	Via Notch		
11.5dpc	Recetores	N1; N2	N3
	Ligandos	D3;D4;J2	D1; D4;J2
	Efetores	H1;H2; H5	H1; H2;H5
12.5dpc	Recetores	N1;N2;N3	N1;N2;N3
	Ligandos	D1;D3;D4;J1;J2	D1; D3;D4;J1;J2
	Efetores	H1;H2;H5	H1;H2;H5
13.5dpc	Recetores	N1;N2;N3	N1;N2;N3
	Ligandos	D1;D3;D4;J1;J2	D1;D3;D4;J1;J2
	Efetores	H1;H2;H5	H1; H2;H5
14.5dpc	Recetores	N1;N2;N3	N1;N2;N3
	Ligandos	D1;D3;D4;J1;J2	D1;D3; D4;J1;J2
	Efetores	H1;H2;H5	H1;H2;H5
15.5dpc	Recetores	N1;N2; N3	N1;N2;N3
	Ligandos	D1;D3;D4;J1; J2	D1; D3;D4;J1;J2
	Efetores	H1;H2; H5	H1;H2; H5

Após a análise do padrão de expressão dos membros da via Notch no desenvolvimento da gónada embrionária, procedeu-se ao estudo *in vivo* da função do ligando Dll4 na gónada de ratinho, tendo sido utilizada a linha de murganhos transgénicos Dll4 lox/lox CAG-Cre. O estudo da função do ligando Dll4 pareceu-nos relevante devido ao padrão de expressão observado durante o desenvolvimento da gónada masculina e feminina. Observou-se a presença de Dll4 na gónada masculina e feminina desde o início da sua formação aos 10.5dpc, e a expressão do ligando continuou ao longo do desenvolvimento da gónada. No macho a partir dos 12.5dpc a expressão deste ligando torna-se específica das células intersticiais de Leydig. Deste modo, a análise da função deste ligando no processo de desenvolvimento da gónada embrionária parece ser relevante para tentar perceber qual a sua importância neste processo, na formação da gónada bipotencial e determinação do sexo.

Numa primeira abordagem, as fêmeas gestantes foram induzidas aos 11.5dpc com 1.5mg de tamoxifeno e os embriões foram recolhidos aos 13.5dpc. A escolha destas datas para indução das fêmeas gestantes e recolha de embriões está relacionada com o facto de o ligando Dll4 estar presente na gónada feminina e masculina desde os 10.5dpc nas células da linha germinativa, e a partir dos 12.5dpc na gónada masculina a presença deste ligando se tornar específica das células intersticiais de Leydig.

A análise macroscópica dos embriões de 13.5dpc permitiu observar diferenças entre os embriões recolhidos, sendo que parte dos embriões apresentavam uma aparência morfológica compatível com a idade de desenvolvimento, e alguns dos embriões recolhidos apresentavam dimensões menores, atraso no desenvolvimento dos membros e hemorragias em algumas regiões do corpo (Figura 23). As secções das gónadas destes embriões foram analisadas pela coloração HE, não se observando diferenças morfológicas nas gónadas embrionárias entre os embriões controlo e induzidos. As secções dos embriões com a região da gónada foram posteriormente analisadas pela técnica de imunofluorescência. Nesta técnica foram utilizados os anticorpos anti-Dll4 e anti-PECAM, e não se observaram diferenças no padrão de marcação destes anticorpos nas gónadas dos animais controlo e induzidos, de machos e de fêmeas. O facto de não se observarem diferenças na marcação pelo anticorpo Dll4 é sugestivo de que não tenha havido perda-de-função deste gene nos animais induzidos, pois seria de esperar que estes animais tivessem menor marcação com este anticorpo. Para confirmar se ocorreu perda-de-função nos animais induzidos teria sido importante recolher tecido embrionário para fazer análise por Real-time PCR.

Esta análise permitiria analisar os níveis de perda-de-função do gene Dll4 nos embriões, e assim, perceber se as doses de tamoxifeno utilizadas para a indução das fêmeas gestantes são adequadas, e também escolher os animais induzidos com um maior nível de perda-de-função de Dll4 para análise da secção de gónada.

Deste modo, esta parte do trabalho realizado não permitiu concluir acerca da função do ligando Dll4 no desenvolvimento da gónada, pois apesar de não se terem observado diferenças morfológicas nas gónadas de animais controlo e induzidos, registaram-se diferenças macroscópicas aquando da dissecação. Assim, não foi possível perceber se este gene não terá influência no processo de desenvolvimento da gónada, ou se o nível de perda-de-função dos animais induzidos analisados não terá permitido observar as diferenças entre estes e os animais controlo.

Para aprofundar o estudo *in vivo* da função do ligando Dll4 na formação da gónada embrionária do murganho iniciaram-se experiências em que as fêmeas gestantes foram induzidas com 1,5mg de tamoxifeno aos 9,75dpc e os embriões recolhidos para análise aos 11,5dpc. A escolha desta janela temporal prende-se com o facto de o processo de formação da gónada ocorrer por volta dos 10.5dpc na região urogenital, e de o ligando Dll4 estar expresso na gónada de fêmea e de macho desde esta fase do desenvolvimento. Contudo, não foi possível obter embriões nesta fase de desenvolvimento embrionário para análise. O facto de não se terem obtido embriões de 11.5dpc com perda-de-função do gene Dll4 pode estar relacionado com inúmeros fatores, tais como diferenças na temperatura do biotério e *stress* causado por ruídos externos ao biotério. A perda-de-função do gene Dll4 numa fase precoce do desenvolvimento embrionário pode, ainda, provocar alterações no embrião que impeçam que este se desenvolva corretamente.

Será importante a realização de trabalhos futuros que permitam aprofundar o estudo da função do ligando Dll4 no desenvolvimento da gónada.

O objetivo de avaliar a função do ligando Dll4 no desenvolvimento da gónada não foi cumprido, mas este trabalho permitiu adquirir novos conhecimentos acerca da via de sinalização Notch no desenvolvimento da gónada embrionária de ratinho, permitindo sugerir que esta via estará envolvida no processo de desenvolvimento da gónada embrionária de macho e de fêmea.

7. Conclusão

Neste trabalho observou-se que os recetores, os ligandos e os efetores da via de sinalização se encontram expressos na gónada embrionária de macho e fêmea ao longo do seu desenvolvimento. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os trabalhos desenvolvidos anteriormente por outros autores, e permitem uma análise mais completa da via na gónada embrionária ao adicionar dados de expressão de componentes da via Notch ainda não estudados. Estes resultados permitem sugerir que esta terá um papel no desenvolvimento da gónada a nível embrionário e relacionada com a regulação das células de Leydig fetais na gónada de macho. Na gónada de fêmea observou-se durante o seu desenvolvimento a presença de membros e efetores da via Notch nas células germinativas, facto que não tinham sido anteriormente descrito nesta fase de desenvolvimento na fêmea.

Embora não se tenham encontrado diferenças entre as gónadas dos animais com e sem perda de função do gene *Dll4*, não se pode concluir acerca da função deste ligando no desenvolvimento da gónada embrionária pois a análise dos embriões recolhidos não foi conclusiva.

8. Bibliografia

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), 770–6.
- Bernard, P., & Harley, V. R. (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 31–43. doi:10.1016/j.biocel.2006.06.007
- Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(10), 1631–46. doi:10.1007/s00018-009-8668-7
- Boyer, A., Lapointe, E., Zheng, X., Cowan, R. G., Li, H., Quirk, S. M., ... Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(8), 3010–25. doi:10.1096/fj.09-145789
- Clapcote, S. J., & Roder, J. C. (2005). Simplex PCR assay for sex determination in mice. *BioTechniques*, 38(5), 702, 704, 706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15945368>
- Defalco, T., Saraswathula, A., Briot, A., Iruela-Arispe, M. L., & Capel, B. (2013a). Testosterone levels influence mouse fetal Leydig cell progenitors through notch signaling. *Biology of Reproduction*, 88(4), 91. doi:10.1095/biolreprod.112.106138
- Defalco, T., Saraswathula, A., Briot, A., Iruela-Arispe, M. L., & Capel, B. (2013b). Testosterone levels influence mouse fetal Leydig cell progenitors through notch signaling. *Biology of Reproduction*, 88(4), 91. doi:10.1095/biolreprod.112.106138
- Dirami, G., Ravindranath, N., Achi, M. V., & Dym, M. (2001). Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *Journal of Andrology*, 22(6), 944–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700858>
- Eggers, S., & Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 20(1), 215–38. doi:10.1007/s10577-012-9274-3
- Fischer, A., & Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4583–96. doi:10.1093/nar/gkm477

- Fiúza, U.-M., & Arias, A. M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of Endocrinology*, 194(3), 459–74. doi:10.1677/JOE-07-0242
- Garcia, T. X., DeFalco, T., Capel, B., & Hofmann, M.-C. (2013). Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Developmental Biology*, 377(1), 188–201. doi:10.1016/j.ydbio.2013.01.031
- Garcia, T. X., & Hofmann, M.-C. (2013a). NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(16), 2538–45. doi:10.4161/cc.25627
- Garcia, T. X., & Hofmann, M.-C. (2013b). NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(16), 2538–45. doi:10.4161/cc.25627
- Geijsen, N. (2008). Modeling germ cell differentiation. *StemBook*, 1–6. doi:10.3824/stembook.1.29.1
- Hasegawa, K., Okamura, Y., & Saga, Y. (2012). Notch signaling in Sertoli cells regulates cyclical gene expression of Hes1 but is dispensable for mouse spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 206–15. doi:10.1128/MCB.06063-11
- Hayashi, S., & McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology*, 244(2), 305–18. doi:10.1006/dbio.2002.0597
- Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Xia, G., Kihara, K., & Oshima, H. (2001). Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *Journal of Andrology*, 22(6), 999–1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700865>
- Heikkilä, M., Peltoketo, H., & Vainio, S. (2001). Wnts and the female reproductive system. *The Journal of Experimental Zoology*, 290(6), 616–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748610>
- Iso, T., Kedes, L., & Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 194(3), 237–55. doi:10.1002/jcp.10208
- Jaisser, F. (2000). Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11 Suppl 1, S95–S100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065338>
- Johnson, J., Espinoza, T., McGaughey, R. W., Rawls, a, & Wilson-Rawls, J. (2001). Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mechanisms of Development*, 109(2), 355–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731249>

- Kim, Y., & Capel, B. (2006). Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(9), 2292–300. doi:10.1002/dvdy.20894
- Koopman, P. (2001). Gonad development: signals for sex. *Current Biology : CB*, 11(12), R481–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448791>
- Manuscript, A. (2012). NIH Public Access, 31(1), 11–15. doi:10.2164/jandrol.109.008318.Fetal
- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, 262(1), 1–15. doi:10.1016/S0012-1606(03)00214-8
- Mohr, O. L. (1919). 7, 1918., 275–282.
- Morgan, P. R. T. H. M. (1917). Electronic Scholarly Publishing <http://www.esp.org>.
- Mori, S., Kadokawa, Y., Hoshinaga, K., & Marunouchi, T. (2003). Sequential activation of Notch family receptors during mouse spermatogenesis. *Development, Growth & Differentiation*, 45(1), 7–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12630942>
- Mumm, J. S., & Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Developmental Biology*, 228(2), 151–65. doi:10.1006/dbio.2000.9960
- Murta, D., Batista, M., Silva, E., Trindade, a, Mateus, L., Duarte, a, & Lopes-da-Costa, L. (2014). Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility, and Development*. doi:10.1071/RD13399
- Murta, D., Batista, M., Silva, E., Trindade, A., Henrique, D., Duarte, A., & Lopes-da-Costa, L. (2013). Dynamics of Notch pathway expression during mouse testis post-natal development and along the spermatogenic cycle. *PloS ONE*, 8(8), e72767. doi:10.1371/journal.pone.0072767
- Poulson, D. F. (1937). CHROMOSOMAL DEFICIENCIES AND THE EMBRYONIC, 23.
- Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). Review series The ovary : basic biology and clinical implications, 120(4), 963–972. doi:10.1172/JCI41350.critical
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), 37–49. doi:10.1038/nrm2815

- Ross, A. J., & Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 16(1), 19–25. doi:10.1016/j.tem.2004.11.004
- Stricklett, P. K., Nelson, R. D., & Kohan, D. E. (1999). The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *The American Journal of Physiology*, 276(5 Pt 2), F651–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330046>
- Tang, H., Brennan, J., Karl, J., Hamada, Y., Raetzman, L., & Capel, B. (2008). Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development (Cambridge, England)*, 135(22), 3745–53. doi:10.1242/dev.024786
- Thurston, G., Noguera-troise, I., & Yancopoulos, G. D. (2007). The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Cancer*, 7(May), 327–331.
- Trombly, D. J., Woodruff, T. K., & Mayo, K. E. (2009). Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology*, 150(2), 1014–24. doi:10.1210/en.2008-0213
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, a, Chin, N., & McMahon, a P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405–9. doi:10.1038/17068
- Vorontchikhina, M. a, Zimmermann, R. C., Shawber, C. J., Tang, H., & Kitajewski, J. (2005). Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expression Patterns : GEP*, 5(5), 701–9. doi:10.1016/j.modgep.2005.02.001
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–62. doi:10.1038/nature01262
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87(1), 1–28. doi:10.1152/physrev.00009.2006
- Wu, X., Wan, S., & Lee, M. M. (2007). Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 429–33. doi:10.1002/jcp.21231
- Xu, J., & Gridley, T. (2013). Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biology*, 11(1), 13. doi:10.1186/1741-7007-11-13
- Yao, H. H., & Barsoum, I. (n.d.). Fetal Leydig Cells, 47–54.
- Zhang, C.-P., Yang, J.-L., Zhang, J., Li, L., Huang, L., Ji, S.-Y., ... Liu, Y.-X. (2011). Notch signaling is involved in ovarian follicle development by

regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology*, 152(6), 2437–47.
doi:10.1210/en.2010-1182

Anexos

Anexo I – Extração de ADN genómico a partir de biópsia da cauda de murganho

- Digerir as caudas durante a noite a 55°C numa solução de 750µL de *digestion buffer* (730µL de *tail buffer* e 20µL de proteinase k);
- Adicionar 250µL de NaCl 5M e agitar os tubos de 1,5ml à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 13000rpm durante vinte minutos;
- Recolher o sobrenadante para novos tubos devidamente identificados;
- Adicionar 750µL de isopropanol e agitar suavemente para que ocorra precipitação do ADN;
- Centrifugar a 13000rpm durante dez minutos;
- Rejeitar o sobrenadante e lavar o precipitado adicionando a cada tubo 500µL de etanol a 70%, e inverter os tubos algumas vezes.
- Centrifugar a 13000rpm durante cinco minutos;
- Rejeitar o sobrenadante ao máximo e deixar secar o precipitado;
- Ressuspender o precipitado em 250µL de tampão TE e guardar as amostras a -20°C.

Anexo II – Protocolo de PCR para determinação da presença de Cre

Mix

Buffer 5x: 4 μ L

dNTPs 10mM: 0,5 μ L

MgCl₂: 1,6 μ L

Primer 1 (10 μ M): 0,5 μ L

Primer 2 (10 μ M): 0,5 μ L

H₂O: 10,7 μ L

Taq: 0,4 μ L

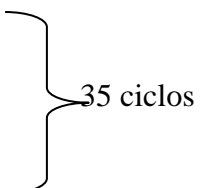
ADN: 2 μ L

Volume total: 20 μ L

Programa

95°C: 3 minutos 1 ciclo

95°C: 30 segundos
60°C: 30 segundos
72°C: 35 segundos



35 ciclos

72°C: 3 minutos 1 ciclo

4°C: ∞

Sequência dos oligonucleótidos iniciadores:

Cre 31U: 5'- CCAGCTAAACATGCTTCATC - 3'

Cre 6831: 5' – CGCTCGACCAGTTTAGTTAC-3'

Tamanho da banda Cre: 350pb

Anexo III – Protocolo de preparação do tamoxifeno

- Pesar o tamoxifeno dentro de um tubo, requer a utilização de máscara;
- Juntar álcool absoluto, cujo volume corresponde a 10% do volume da solução final (se o volume final for por exemplo 5ml, temos que adicionar 500µl de álcool).
- Juntar o óleo Cremophor, cujo volume corresponde a 90% do volume da solução final.
- Sonicar a solução
 - Limpar a sonda com álcool;
 - Introduzir o tubo com a solução dentro do copinho de plástico com gelo;
 - Baixar a plataforma, desenroscando o parafuso;
 - Colocar o copo com o tubo sobre a plataforma e mergulhar a sonda, sem bater nas paredes do tubo;
 - Subir a plataforma e ligar com a potência de 40% durante cerca de dez minutos, fazendo um intervalo ao fim de cinco minutos.

Anexo IV – Extração de ADN genómico a partir de tecidos embrionários

- Digerir os tecidos embrionários durante a noite a 55°C numa solução de *digestion buffer* (365µL de *tail buffer* e 10µL de proteinase);
- Adicionar 125µL de NaCl 5M e agitar à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 13000rpm durante vinte minutos;
- Recolher o sobrenadante para novos tubos devidamente identificados;
- Adicionar 375µL de isopropanol e agitar suavemente para que ocorra precipitação do ADN;
- Centrifugar a 13000rpm durante dez minutos;
- Rejeitar o sobrenadante e lavar o *pellet* adicionando a cada tubo 250µL de etanol a 70% e invertendo os tubos algumas vezes.
- Centrifugar a 13000rpm durante cinco minutos;
- Rejeitar o sobrenadante ao máximo e deixar secar o *pellet*;
- Ressuspender o *pellet* em 250µL de TE e guardar os tubos a -20°C.

Anexo V - Protocolo de PCR para sexagem dos embriões

Mix

Buffer 5x: 5 μ L

dNTPs 2mM: 2,5 μ L

MgCl₂: 1,6 μ L

Primer 1 (10 μ M): 1,25 μ L

Primer 2 (10 μ M): 1,25 μ L

H₂O: 11,2 μ L

Taq: 0,2 μ L

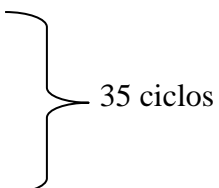
ADN: 2 μ L

Volume total: 25 μ L

Programa

94°C: 5 minutos 1 ciclo

94°C: 20 segundos
54°C: 1 minuto
72°C: 40 segundos



35 ciclos

72°C: 10 minutos 1 ciclo

4°C: ∞

Sequência dos oligonucleótidos iniciadores:

Jard1: 5'- CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG- 3'

Jard2: 5' – GGTTTCTTAAACCGTCACC-3'

Tamanho da banda: ♂ 331pb e 302pb; ♀ 331pb

